

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 172**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2008 E 08736081 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 2132313**

54 Título: **Inhibidores de MRP4 para el tratamiento de trastornos vasculares**

30 Prioridad:

10.04.2007 EP 07290433

19.12.2007 EP 07301710

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

13.12.2013

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (100.0%)

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR

72 Inventor/es:

HULOT, JEAN-SÉBASTIEN;

LOMPRE, ANNE-MARIE;

SASSI, YASSINE y

LECHAT, PHILIPPE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 434 172 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

Inhibidores de MRP4 para el tratamiento de trastornos vasculares

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a inhibidores de la proteína multifarmacorresistente 4 (MRP4) para uso en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno vascular seleccionado del grupo consistente en aterosclerosis, reestenosis postangioplástica, hipertensión arterial pulmonar y enfermedad de injerto venoso, mediante la inhibición de la proliferación o el crecimiento de células de músculo liso.

10 La presente invención se refiere a la regulación génica y a la fisiología celular de células de músculo liso. Específicamente, la invención se refiere al uso de inhibidores de MRP4 para bloquear el flujo de nucleótidos cíclicos fuera de las células.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La proliferación y crecimiento celulares son dos mecanismos que conducen a la remodelación vascular observados comúnmente en células musculares vasculares en respuesta a diversos estímulos patológicos. Una proliferación excesiva de células de músculo liso es un proceso fundamental que contribuye a la respuesta de lesión en los vasos arteriales principales. Dicho proceso está implicado en numerosos trastornos vasculares, incluyendo aterosclerosis, reestenosis postangioplástica, hipertensión arterial pulmonar y enfermedad de injerto venoso (Dzau VJ *et al.*, 2002; Novak K., 1998). Por tanto, identificar modificadores de la proliferación de células de músculo liso vascular (VSMC) es un enfoque importante de investigación en biología y medicina cardiovascular.

20 Se observa un patrón estereotípico de cambios en la expresión génica que incluyen la reexpresión de genes fetales. Dichas diferencias están controladas por rutas de señalización subyacentes particulares. Los avances en la descripción de las rutas de señalización implicadas en la proliferación patológica de células de músculo liso vascular han apuntado a rutas reguladoras controladas por nucleótidos cíclicos. Los nucleótidos cíclicos, a saber 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) y 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) son segundos mensajeros clave que actúan como reguladores negativos de la proliferación de células de músculo liso. La síntesis de AMP cíclico o GMP cíclico está catalizada por las enzimas adenilato o guanilato ciclasa, respectivamente (McDonald y Murad, 1996; Sunahara *et al.*, 1996). La elevación de las concentraciones intracelulares de AMPc y GMPc por análogos de AMPc o GMPc inhibe, independientemente ambas, la proliferación de células de músculo liso vascular de conejo (Assender JW *et al.*, 1992). La reexpresión de proteína cinasa G (PKG) activa constitutivamente (o PKG de tipo silvestre con estimulación de GMPc) inhibe la migración de VSMC, potencia la apoptosis, reduce la proliferación y disminuye la formación de neointima después de lesión vascular (Boerth NJ *et al.*, 1997; Sinnaeve P *et al.* 2002).

25 Siguiendo estos resultados, se ha centrado el enfoque en el proceso implicado en la eliminación de nucleótidos cíclicos. Estos nucleótidos cíclicos pueden degradarse por miembros específicos de la superfamilia de fosfodiesterasas (PDE) que son responsables de la hidrólisis de AMPc y GMPc intracelulares (Rybalkin *et al.*, 2003).

35 Recientemente, Chen *et al.* (JBC; 2001) han reseñado que AMPc y GMPc pueden transportarse también por transportadores de flujo activo, a saber las proteínas de multifarmacorresistencia (MRP) MRP4 y MRP5, codificadas por los genes transportadores de módulo de unión a ATP de clase C (ABCC) 4 y ABCC5, respectivamente. Entre esta familia de transportadores, MRP4 y MRP5 muestran una alta afinidad por AMPc y GMPc. Sin embargo, hasta la fecha, la función fisiológica de estas proteínas sigue sin aclarar. Recientemente, se han identificado a MRP4 y MRP5 como bombas de exportación dependientes de ATP para nucleótidos cíclicos (Jedlitschky *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001) y se ha mostrado que MRP4 y MRP5 se expresan en arterias coronaria y pulmonar porcinas (Mitani *et al.*; 2003).

40 El documento WO2005044244 da a conocer el uso de inhibidores de la proteína multifarmacorresistente 4 (MRP4) en trombocitos para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades cardiovasculares.

45 SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención demuestra formalmente por primera vez que la proliferación de células de músculo liso puede inhibirse inhibiendo MRP4.

50 La invención se refiere a un inhibidor de MRP4 para uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad vascular seleccionada del grupo consistente en aterosclerosis, reestenosis postangioplástica, hipertensión arterial pulmonar y enfermedad de injerto venoso, mediante la inhibición del crecimiento y proliferación de células de músculo liso.

La invención se refiere a un método para tratar un trastorno vascular en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de MRP4.

La invención se refiere también al uso de un inhibidor de MRP4 en la fabricación de un medicamento para inhibir la proliferación de células de músculo liso.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones:

5 El término "MRP4" tiene su significado general en la materia y hace referencia a la proteína multifarmacorresistente 4. MRP4 se designa también como proteína ABCC4, miembro 4 de la subfamilia C (CFTR/MRP) de módulo de unión a ATP, EST 170205, transportador ABC relacionado con MRP/cMOAT (MOATB), transportador B aniónico orgánico multiespecífico (MOATB) y proteína 4 asociada a multifarmacorresistencia en la materia. El término puede incluir MRP4 de origen natural y variantes y formas modificadas de la misma. El término puede hacer referencia también a
10 proteínas de fusión en que un dominio de MRP4 que retiene al menos una actividad de MRP4 está fusionado, por ejemplo, con otro polipéptido (por ejemplo, un marcaje polipeptídico tales como son convencionales en la materia). La MRP4 puede ser de cualquier fuente, pero es típicamente una MRP4 de mamífero (por ejemplo, de ser humano y primate no humano), particularmente una MRP4 humana. Se proporciona una secuencia aminoacídica nativa ejemplar de MRP4 en la base de datos GenPept con número de acceso AAH41560 y se proporciona una secuencia nucleotídica nativa ejemplar que codifica MRP4 en la base de datos GenBank con número de acceso NM_005845.

La expresión "inhibidor de MRP4" debería entenderse en el sentido amplio, engloba inhibidores del eflujo celular de nucleótidos cíclicos mediado por MRP4, llamado de aquí en adelante actividad de MRP4, e inhibidores de la expresión de MRP4.

20 Un "inhibidor de la expresión" hace referencia a un compuesto natural o sintético que tiene el efecto biológico de inhibir o reducir significativamente la expresión de un gen. En consecuencia, un "inhibidor de la expresión de MRP4" hace referencia a un compuesto natural o sintético que tiene el efecto biológico de inhibir o reducir significativamente la expresión del gen que codifica MRP4.

25 Como se usa en la presente memoria, el término "inhibidor selectivo de MRP4" hace referencia a un inhibidor que es selectivo de MRP4 en comparación con otras proteínas multifarmacorresistentes (MRP) tales como MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, MRP6, MRP7, MRP8, MRP9, MRP10, MRP11, MRP12 y MRP13. Se entiende por "selectivo" que la K_i del inhibidor de MRP4 sea al menos 5 veces, preferiblemente 10 veces, más preferiblemente 25 veces, aún más preferiblemente 100 veces menor que la K_i de otras MRP. La K_i de un inhibidor de MRP4 puede determinarse usando diversos métodos bien conocidos en la materia.

30 El término "molécula orgánica pequeña" hace referencia a una molécula de un tamaño comparable a aquellas moléculas orgánicas usadas generalmente en farmacia. El término excluye las macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas oscilan en el intervalo de tamaño de hasta aproximadamente 5000 Da, más preferiblemente hasta 2000 Da y lo más preferiblemente hasta aproximadamente 1000 Da.

35 Como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" denota un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferiblemente, el sujeto según la invención es un ser humano.

En su sentido más amplio, el término "tratar" o "tratamiento" hace referencia a la reversión, alivio, inhibición de la progresión o prevención del trastorno o afección al que se aplica dicho término, o de uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.

40 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra indeseada cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, como sea apropiado. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable hace referencia a una carga, diluyente, material encapsulante o auxiliar de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico de cualquier tipo.

45 Se entiende por "biocompatible" un material que desencadena una reacción de tejido nula o negativa mínima incluyendo, por ejemplo, la formación de trombos y/o inflamación.

Métodos y usos terapéuticos

50 La presente invención proporciona métodos y composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) para inhibir la proliferación de células de músculo liso, en particular células de músculo liso arterial. La presente invención proporciona también métodos y composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) para tratar y/o prevenir trastornos vasculares tales como aterosclerosis, reestenosis postangioplástica, hipertensión arterial pulmonar y enfermedad de injerto venoso.

Por tanto, es un objeto de la invención un inhibidor de MRP4, preferiblemente selectivo, para uso en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno vascular seleccionado del grupo consistente en aterosclerosis, reestenosis

postangioplástica, hipertensión arterial pulmonar y enfermedad de injerto venoso, mediante la inhibición de la proliferación de células de músculo liso.

En una realización preferida, el inhibidor de MRP4 es un inhibidor selectivo de MRP4.

5 En una realización, el inhibidor de MRP4 puede ser un inhibidor de bajo peso molecular, por ejemplo, una molécula orgánica pequeña. Se dan ejemplos de inhibidor de MRP4 en el documento US2006/0286041, en Reid *et al.* (*Molecular Pharmacology*, 63: 1094-1103, 2003) y en Remon *et al.* (*J. Am. Soc. Nephrol.* 13: 595-603, 2002).

10 Los inhibidores de MRP4 orgánicos pequeños que pueden usarse por la invención incluyen, pero sin limitación, compuestos seleccionados del grupo consistente en *N*-acetildinitrofenilcisteína, benzobromarona, colato, diclofenaco, dipirimadol, 3-glucurónido de deshidroepiandrosterona, 3-sulfato de deshidroepiandrosterona, dilazep, dinitrofenil-5-glutation, 17- $[\beta]$ -glucurónido de estradiol, 3,17-disulfato de estradiol, 3-glucurónido de estradiol, 3-sulfato de estradiol, 3-sulfato de estrona, flurbiprofeno, folato, tetrahidrofolato de N5-formilo, glicocolato, sulfato del ácido glicolítico, ibuprofeno, indometacina, indoprofeno, ketoprofeno, sulfato del ácido litocólico, metotrexato, MK571 (ácido ([E]-3-[[[3-[2-(7-cloro-2-quinolinil)etenil]fenil]-[[3-dimetilamino)-3-oxopropil]tio]metil]tio]propanoico), $[\beta]$ -O-glucurónido de $[\alpha]$ -naftilo, $[\pi]$ bosida de nitrobencilmercaptapurina, probenecida, PSC833, sulfpirazona, tauroquenosoxicolato, taurocolato, taurodesoxicolato, taurolitocolato, sulfato del ácido taurolitocólico, topotecán, trequinsina, verapamilo y zap $[\pi]$ nast, opcionalmente en forma de racematos, enantiómeros, diastereómeros y opcionalmente sales de adición de ácido farmacológicamente aceptables e hidratos de los mismos.

En una realización preferida, el inhibidor de MRP4 no es un inhibidor de fosfodiesterasa (PDE) seleccionado del grupo consistente en inhibidores de PDE3, inhibidores de PDE4 o inhibidores de PDE5.

20 Se entiende por sales de adición de ácido del inhibidor de MRP4 con ácidos farmacológicamente aceptables, por ejemplo, sales seleccionadas del grupo que comprende hidrocioruro, hidrobromuro, hidroyoduro, hidrosulfato, hidrofosfato, hidrometanosulfonato, hidronitrato, hidromaleato, hidroacetato, hidrobenzoato, hidrocitrato, hidrofumarato, hidrotartrato, hidrooxalato, hidrosuccinato, hidrobenzoato e hidro-*p*-toluenosulfonato, preferiblemente hidrocioruro, hidrobromuro, hidrosulfato, hidrofosfato, hidrofumarato e hidrometanosulfonato. De las sales de adición de ácido mencionadas anteriormente, se prefieren particularmente según la invención las sales de ácido clorhídrico, ácido metanosulfónico, ácido benzoico y ácido acético.

En otra realización, el inhibidor de MRP4 es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que puede bloquear parcial o completamente la actividad de transporte de MRP4 (concretamente, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de bloque parcial o completo de MRP4).

30 En particular, el inhibidor de MRP4 puede consistir en un anticuerpo dirigido contra MRP4, de tal modo que dicho anticuerpo bloquee la actividad de MRP4.

35 Los anticuerpos dirigidos contra MRP4 pueden crearse según métodos conocidos mediante la administración del antígeno o epítipo apropiado a un animal hospedador seleccionado, por ejemplo, de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Pueden usarse diversos coadyuvantes conocidos en la materia para potenciar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales contra MRP4 pueden prepararse y aislarse usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante estirpes celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y aislamiento incluyen, pero sin limitación, la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975); la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Cote *et al.*, 1983) y la técnica de hibridoma de EBV (Cole *et al.* 1985). Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios anti-MRP4. Los inhibidores de MRP4 útiles en la práctica de la presente invención incluyen también fragmentos anti-MRP4 incluyendo, pero sin limitación, fragmentos $F(ab')_2$, que pueden generarse por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacto, y fragmentos Fab, que pueden generarse mediante reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. Como alternativa, pueden construirse colecciones de expresión de Fab y/o scFv para permitir una identificación rápida de los fragmentos que tienen la especificidad deseada por MRP4.

45 Pueden prepararse también anticuerpos anti-MRP4 humanizados y fragmentos de los mismos según técnicas conocidas. Los "anticuerpos humanizados" son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (por ejemplo, de roedor) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que se reemplazan residuos de una región hipervariable (CDR) del receptor por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tengan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se reemplazan residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente la eficacia del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y típicamente dos, dominios variables en que todos o sustancialmente todos

los bucles hipervariables correspondan a aquellos de inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR sean aquellas de la secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Se describen métodos para preparar anticuerpos humanizados, por ejemplo, por Winter (patente de EE.UU. n° 5.225.539) y Boss (Celltech, patente de EE.UU. n° 4.816.397).

En aún otra realización, el inhibidor de MRP4 es un aptámero.

Los aptámeros son una clase de moléculas que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias oligonucleotídicas u oligopeptídicas con la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de molécula diana con alta afinidad y especificidad. Dichos ligandos pueden aislarse mediante evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) de una colección de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. y Gold L., 1990. La colección de secuencias aleatorias es obtenible mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta colección, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una única secuencia. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo restringida conformacionalmente expuesta en una proteína de plataforma, tal como tiorredoxina A de *E. coli*, que se selecciona de colecciones combinatorias mediante métodos de doble híbrido (Colas *et al.*, 1996).

Otro aspecto de la invención se refiere a la expresión de un inhibidor selectivo de MRP4.

Las secuencias de MRP que muestran baja identidad de secuencia (<60%) con los inhibidores de la expresión de MRP4 que pueden usarse según la invención proporcionan ventajosamente una inhibición selectiva de la expresión de MRP4, en comparación con la expresión de otras MRP.

Los inhibidores de la expresión de MRP4 para uso en la presente invención pueden estar basados en constructos oligonucleotídicos anticodificantes. Los oligonucleótidos anticodificantes, incluyendo moléculas de ARN anticodificantes y moléculas de ADN anticodificantes, actuarían bloqueando directamente la traducción de ARNm de MRP4 por unión al mismo y por tanto previniendo la traducción de proteína o aumentando la degradación de ARNm, disminuyendo por tanto el nivel de MRP4 y por tanto la actividad celular, en una célula. Por ejemplo, pueden sintetizarse oligonucleótidos anticodificantes de al menos aproximadamente 15 bases y complementarios de regiones únicas de la secuencia del transcrito de ARNm que codifica MRP4, por ejemplo, mediante técnicas de fosfodiéster convencionales y administrarse, por ejemplo, mediante inyección o infusión intravenosa. Los métodos para uso de técnicas anticodificantes para inhibir específicamente la expresión génica de genes cuya secuencia es conocida son bien conocidos en la materia (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 6.566.135, 6.566.131, 6.365.354, 6.410.323, 6.107.091, 6.046.321 y 5.981.732).

Los ARN inhibidores pequeños (ARNip) pueden funcionar también como inhibidores de la expresión de MRP4 para uso en la presente invención. La expresión de MRP4 puede reducirse poniendo en contacto un sujeto o célula con un ARN bicatenario pequeño (ARNbp) o un vector o constructo, causando la producción de un ARN bicatenario pequeño, de tal modo que se inhiba específicamente la expresión de MRP4 (concretamente, interferencia de ARN o iARN). Los métodos para seleccionar un ARNbp o vector que codifica ARNbp apropiado son bien conocidos en la materia para genes cuya secuencia es conocida (por ejemplo, véanse Tuschl, T. *et al.* (1999); Elbashir, S. M. *et al.* (2001); Hannon, G.J. (2002); McManus, M.T. *et al.* (2002); Brummelkamp, T.R. *et al.* (2002); patentes de EE.UU. n° 6.573.099 y 6.506.559 y publicaciones internacionales de patente n° WO 01/36646, WO 99/32619 y WO 01/68836). Se ha desarrollado un ARNip que silencia eficazmente MRP4. Este ARNip se orientará a las varias variantes de corte y empalme de MRP4 (NM_005845, BC041560, AY081219, AF541977, AY133680, AY133679, AY133678). La secuencia codificante es 5'-CAGUGUUCUACACUCCUTT-3' (SEQ 10 NO:7) y la anticodificante: 5'-AGGAAGUGUAAGAACACUGTT-3' (SEQ 10 NO:8).

Los ARNhc (ARN de horquilla corto) pueden funcionar también como inhibidores de la expresión de MRP4 para uso en la presente invención. Es un ejemplo de un ARN de horquilla corto según la invención el ARNhc que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9: GCAAATGTGGATCCGAGAA.

Las ribozimas pueden funcionar también como inhibidores de la expresión de MRP4 para uso en la presente invención. Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica de ARN. El mecanismo de la acción de la ribozima implica la hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima con el ARN diana complementario, seguido de escisión endonucleolítica. Son así útiles dentro del alcance de la presente invención las moléculas de ribozima de motivo de horquilla o cabeza de martillo genomanipuladas que catalizan específica y eficazmente la escisión endonucleolítica de secuencias de ARNm de MRP4. Los sitios de escisión por ribozima específicos en cualquier diana de ARN potencial se identifican inicialmente barriendo en la molécula diana los sitios de escisión por ribozima, que incluyen típicamente las siguientes secuencias: GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, pueden evaluarse en secuencias de ARN cortas de entre aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión los rasgos estructurales predichos, tales como estructura secundaria, que pueden hacer inadecuada la secuencia oligonucleotídica.

Pueden prepararse mediante métodos conocidos tanto oligonucleótidos anticodificantes como ribozimas útiles como inhibidores de la expresión de MRP4. Estos incluyen técnicas para la síntesis química tales como, por ejemplo, síntesis química por fosforamidita en fase sólida. Como alternativa, pueden generarse moléculas de ARN anticodificantes mediante la transcripción *in vitro* o *in vivo* de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN. Dichas secuencias de ADN pueden incorporarse a una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Pueden introducirse diversas modificaciones en los oligonucleótidos de la invención como medio para aumentar la estabilidad intracelular y la semivida. Las posibles modificaciones incluyen, pero sin limitación, la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de ligamientos de fosfodiesterasa en el esqueleto oligonucleotídico.

Los oligonucleótidos anticodificantes, ARNip, ARNhc y ribozimas de la invención pueden suministrarse *in vivo* solos o asociados con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia de ácido nucleico de oligonucleótido anticodificante, ARNip, ARNhc o ribozima a las células, y preferiblemente células que expresan MRP4. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a células con una degradación reducida respecto a la extensión de la degradación que resultaría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero sin limitación, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes víricas o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación de las secuencias de ácido nucleico de oligonucleótido anticodificante, ARNip, ARNhc o ribozima. Los vectores víricos son un tipo preferido de vector e incluyen, pero sin limitación, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: retrovirus tales como el virus de leucemia de múrido Moloney, virus de sarcoma de múrido Harvey, virus de tumor mamario de múrido y virus de sarcoma de Rous; adenovirus, virus adenoasociados; virus de tipo SV40; poliomavirus; virus de Epstein-Barr; papilomavirus; herpesvirus; virus Vaccinia; poliovirus y virus de ARN tales como retrovirus. Pueden emplearse fácilmente otros vectores no nombrados pero conocidos en la materia.

Los vectores víricos preferidos están basados en virus eucarióticos no citopáticos en que se han reemplazado genes no esenciales por el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (por ejemplo, lentivirus), cuyo ciclo vital implica la transcripción inversa de ARN vírico genómico a ADN con posterior integración provírica en el ADN celular del hospedador. Los retrovirus se han aprobado para ensayos de terapia génica humana. Los más útiles son aquellos retrovirus que son deficientes de replicación (concretamente, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Dichos vectores de expresión retrovíricos alterados genéticamente tienen utilidad general para la transducción de alta eficacia de genes *in vivo*. Los protocolos estándares para producir retrovirus deficientes de replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno a un plásmido, transfección de una estirpe celular de empaquetamiento con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la estirpe celular de empaquetamiento, recogida de partículas víricas de los medios de cultivo de tejido e infección de las células diana con partículas víricas) se proporcionan en Kriegler, 1990 y en Murry, 1991).

Son virus preferidos para ciertas aplicaciones los adenovirus y virus adenoasociados (AAV), que son virus de ADN bicatenarios que ya se han aprobado para uso humano en terapia génica. Son conocidos realmente 12 serotipos de AAV diferentes (AAV1 a 12), cada uno con diferente tropismo de tejido (Wu, *Z. Mol. Ther.* 2006; 14: 316-27). Los AAV recombinantes derivan del parvovirus AAV2 dependiente (Choi, *VW J. Virol.* 2005; 79: 6801-07). Los virus adenoasociados de tipo 1 a 12 pueden genomanipularse para ser deficientes de replicación y son capaces de infectar un amplio intervalo de tipos y especies celulares (Wu, *Z. Mol. Ther.* 2006; 14: 316-27). Tienen adicionalmente ventajas tales como estabilidad térmica y en disolventes lipídicos, altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluyendo células hematopoyéticas y falta de inhibición de la superinfección, permitiendo por tanto múltiples series de transducciones. Aparentemente, el virus adenoasociado puede integrarse en ADN celular humano de manera específica de sitio, minimizando así la posibilidad de mutagénesis de inserción y la variabilidad de la expresión del gen insertado características de la infección retrovírica. Además, las infecciones por virus adenoasociados de tipo silvestre se han seguido en cultivo de tejido durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, implicando que la integración del virus adenoasociado es un evento relativamente estable. El virus adenoasociado puede funcionar también de forma extracromosómica.

Otros vectores incluyen vectores de plásmido. Los vectores de plásmido se han descrito extensamente en la materia y son bien conocidos por los especialistas en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989. En los últimos años, los vectores de plásmido se han usado como vacunas de ADN para suministrar genes que codifican antígenos a células *in vivo*. Son particularmente ventajosos para esto debido a que no tienen los mismos problemas de seguridad que muchos de los vectores víricos. Estos plásmidos, sin embargo, que tienen un promotor compatible con la célula hospedadora, pueden expresar un péptido a partir de un gen codificado operativamente en el plásmido. Algunos plásmidos usados comúnmente incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Son bien conocidos otros plásmidos por los especialistas en la materia. Adicionalmente, los plásmidos pueden diseñarse a medida usando enzimas de restricción y reacciones de ligamiento para retirar y añadir fragmentos específicos de ADN. Los plásmidos pueden suministrarse por una variedad de vías parenteral, mucosa y tópica. Por ejemplo, el plásmido de ADN puede inyectarse por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea u otras. Puede administrarse también por pulverizadores o gotas intranasales, supositorio rectal y por vía oral. Puede administrarse también a la epidermis o una superficie mucosa usando un cañón génico. Los plásmidos pueden dispensarse en disolución

acuosa, secados sobre partículas de oro o asociados con otro sistema de suministro de ADN incluyendo, pero sin limitación, liposomas, dendrímeros, cocleato y microencapsulación.

5 En una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico de oligonucleótido anticodificante, ARNip, ARNbc o ribozima está bajo el control de una región reguladora heteróloga, por ejemplo un promotor heterólogo. El promotor puede ser, por ejemplo, un promotor específico de músculo liso, tal como un promotor de α -actina de músculo liso, el promotor SM22 α . El promotor puede ser también, por ejemplo, un promotor vírico, tal como un promotor de CMV o cualquier promotor sintético. El inhibidor selectivo de la actividad y/o expresión de MRP4 puede administrarse en forma de una composición farmacéutica como se define a continuación.

Preferiblemente, dicho inhibidor se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

10 Se entiende por "cantidad terapéuticamente eficaz" una cantidad suficiente del inhibidor de MRP4 para tratar y/o prevenir trastornos vasculares a una relación de beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

15 Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención se decidirá por el facultativo a cargo dentro del alcance del criterio médico aceptado. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específica para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno que se esté tratando y la gravedad del trastorno, la actividad del compuesto específico empleado, la composición específica empedada, la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo y dieta del paciente, el momento de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado, la duración del tratamiento, los fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado y factores similares bien conocidos en el campo médico. Por ejemplo, está dentro de las habilidades de la técnica empezar las dosis de compuesto a niveles menores que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consigue el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variar en un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto al día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg de ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación en el paciente para tratar. Un medicamento contiene típicamente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Se suministra normalmente una cantidad eficaz del fármaco a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal al día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal al día.

Métodos de cribado:

30 Los inhibidores de la invención pueden identificarse adicionalmente mediante métodos de cribado descritos en el estado de la técnica. Los métodos de cribado de la invención pueden llevarse a cabo según métodos conocidos.

35 El método de cribado puede medir la unión de un compuesto candidato a MRP4, o a células o membranas portadoras de MRP4, o a una proteína de fusión de la misma mediante un marcaje asociado directa o indirectamente con el compuesto candidato. Como alternativa, el método de cribado puede implicar medir o detectar cualitativa o cuantitativamente la competición de unión de un compuesto candidato al receptor con un competidor marcado (por ejemplo, inhibidor o sustrato).

40 Por ejemplo, puede insertarse ADNc de MRP4 en un vector de expresión que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada. Pueden utilizarse los siguientes sistemas de vector/hospedador tales como baculovirus/células de insecto Sf9; retrovirus/estirpes celulares de mamífero como HepB3, LLC-PK1, MDCKII, CHO, HEK293; vector de expresión/estirpes celulares de mamífero como HepB3, LLC-PK1, MDCKII, CHO, HEK293. Dichos vectores pueden usarse entonces para transfectar células, de modo que dichas células expresen MRP4 recombinante en su membrana. También es posible usar estirpes celulares que expresen proteína MRP4 endógena (THP-1, U937, WI-38, WI-38 (subestirpe VA-13), IMR-90, HEK-293).

45 Las células obtenidas como se describe anteriormente pueden preincubarse con compuestos de ensayo y estimularse posteriormente con compuestos conocidos por elevar la producción celular de AMPc y/o GMPc (tales como forskolina e isoprenalina para AMPc y SNP para GMPc). Se criba en los compuestos de ensayo su capacidad de potenciar los niveles intracelulares de AMPc y/o GMPc y de reducir los niveles extracelulares de AMPc y/o GMPc.

50 En una realización adicional, pueden prepararse vesículas de membrana a partir de estirpes celulares obtenidas como se describe anteriormente. Las vesículas de membrana pueden preincubarse entonces con compuestos de ensayo. Posteriormente, se añaden AMPc, ATP y sistemas de regeneración de ATP (creatina cinasa y fosfato de creatina) a las vesículas de membrana y se criba en los compuestos su capacidad de inhibir la acumulación de AMPc dentro de las vesículas de membrana.

Composiciones farmacéuticas:

Un objeto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica para tratar y/o prevenir trastornos vasculares tales como aterosclerosis, reestenosis postangioplástica, hipertensión arterial pulmonar o enfermedad de injerto venoso, en el que dicha composición comprende un inhibidor selectivo de la expresión y/o actividad de MRP4.

5 El inhibidor de MRP4 puede combinarse con un excipiente farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, una matriz de liberación mantenida tal como polímeros biodegradables, formando composiciones terapéuticas.

10 En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, puede administrarse el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, en una forma de administración unitaria, como mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas de vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o disoluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

15 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que puede inyectarse. Estos pueden ser en particular disoluciones salinas estériles isotónicas (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que tras adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o disolución salina fisiológica, permiten la constitución de disoluciones inyectables.

20 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles, formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

25 Las disoluciones que comprenden compuestos de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones pueden prepararse también en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

30 El inhibidor de MRP4 de la invención puede formularse en una composición en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácidos fosfóricos, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con grupos carboxilo libres pueden derivar también de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

35 El portador puede ser también un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido, en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede causarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. Puede causarse la absorción prolongada de las composiciones inyectables por el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

45 Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida al disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes enumerados anteriormente, como se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados a un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado a vacío y liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución anteriormente esterilizada por filtración del mismo.

50 Tras la formulación, se administrarán las disoluciones de manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad como sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero pueden emplearse también cápsulas de liberación de fármaco y similares.

55 Para administración parenteral en disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debería tamponarse adecuadamente si es necesario y hacerse primero el diluyente líquido isotónico con suficiente disolución salina o glucosa. Estas

disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los especialistas en la materia teniendo en cuenta la presente divulgación. Por ejemplo, podría disolverse una dosificación en 1 ml de disolución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclinis o inyectarse en el sitio de infusión propuesto. Aparecerá necesariamente cierta variación de la dosificación dependiendo del estado del sujeto que se esté tratando. El responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

El inhibidor de MRP4 de la invención puede formularse en una mezcla terapéutica que comprende de aproximadamente 0,0001 a 1,0 mg, o de aproximadamente 0,001 a 0,1 mg, o de aproximadamente 0,1 a 1,0 mg o incluso aproximadamente 10 mg por dosis o así. Pueden administrarse también dosis múltiples.

Además de los compuestos de la invención formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposómicas; cápsulas de liberación retardada y cualquier otra forma usada actualmente.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir cualquier agente adicional que tenga la capacidad de limitar la eliminación de nucleótidos cíclicos (GMPc, AMPc). Dichos agentes pueden incluir, pero sin limitación, inhibidores específicos de la familia de las fosfodiesterasas (PDE), incluyendo inhibidores de PDE3, PDE4 y PDE5. Los ejemplos de inhibidores de PDE4 incluyen rolipram y aquellos descritos en los documentos de patente US2005234238, DE10156229, DE10135009 y W00146151. Los ejemplos de inhibidores de PDE5 incluyen sildenafil, vardenafilo y tadalafilo. Se prefieren particularmente los inhibidores de PDE5 que están comercializados, por ejemplo VIAGRA® que es citrato de sildenafil y que puede administrarse de esta forma. Otros ejemplos de inhibidores de PDE5 incluyen también aquellos descritos en los documentos de patente WO2005012303 y US2006106039.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir cualquier otro agente antiproliferativo que reduzca la proliferación de células de músculo liso. Por ejemplo, el agente antiproliferativo puede ser rapamicina, derivados de rapamicina, paclitaxel, docetaxel, 40-O-(3-hidroxi)propilrapamicina, 40-O-[2-(2-hidroxi)etoxi]etilrapamicina y 40-O-tetrazolrapamicina, ABT-578, everolímús y combinaciones de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir compuestos seleccionados del grupo consistente en anticuerpos, ligandos de receptor, enzimas, péptidos de adhesión, oligosacáridos, oligonucleótidos y similares. Dichos compuestos pueden ser factores de coagulación sanguínea, inhibidores o agentes disolventes de coágulos tales como estreptocinasa y activador de plasminógeno de tejido. Dichos agentes pueden incluir también un fármaco promotor de la curación que confiere una respuesta neointima benigna caracterizada por una proliferación controlada de células de músculo liso y una deposición controlada de matriz extracelular con cobertura luminal completa por células endoteliales fenotípicamente funcionales (similares a íntima sana no lesionada) y morfológicamente normales (similares a íntima sana no lesionada). Dichos compuestos pueden entrar también dentro del género de las sustancias antineoplásicas, citostáticas, antiinflamatorias, antiplaquetarias, anticoagulantes, agentes antifibrina, antitrombina, antimitóticas, antibióticas, antialérgicas y antioxidantes. Los ejemplos de dichos antineoplásicos y/o antimitóticos incluyen paclitaxel (por ejemplo, TAXOL® de BristolMyers Squibb Co., Stamford, Conn.), docetaxel (por ejemplo, Taxotere®, de Aventis S.A., Frankfurt, Alemania), metotrexato, azatioprina, vincristina, vinblastina, fluorouracilo, hidrocloreuro de doxorubicina (por ejemplo, Adriamycin® de Pharmacia & Upjohn, Peapack N. J.) y mitomicina (por ejemplo, Mutamycin® de Bristol-Myers Squibb Co., Stamford, Conn.). Los ejemplos de dichos antiplaquetarios, anticoagulantes, agentes antifibrina y antitrombina incluyen heparinoides, hirudina, hirudina recombinante, argatroban, forscolina, vapiroprost, prostaciclina y análogos de prostaciclina, dextrano, D-phe-pro-arg-clorometilcetona (antitrombina sintética), dipiridamol, antagonista de receptor de membrana de plaqueta glucoproteína IIb/IIIa, anticuerpo e inhibidores de trombina tales como Angiomax® (Biogen, Inc., Cambridge, Mass.). Los ejemplos de agentes citostáticos incluyen angiopeptina, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina tales como captopril (por ejemplo, Capoten y Capozide® de Bristol-Myers Squibb Co., Stamford, Conn.), cilazapril o lisinopril (por ejemplo, Prinivil® y Prinzide® de Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ), actinomicina D o derivados y análogos de los mismos. Los sinónimos de actinomicina D incluyen dactinomicina, actinomicina IV, actinomicina I1, actinomicina X1 y actinomicina Ci. Otros compuestos incluyen bloqueantes de canal de calcio (tales como nifedipina), colquicina, antagonistas de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), aceite de pescado (ácido graso omega 3), antagonistas de histamina, lovastatina (un inhibidor de HMG-CoA reductasa, un fármaco reductor del nivel de colesterol de nombre comercial Mevacor® de Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ), anticuerpos monoclonales (tales como aquellos específicos de receptores de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)), nitroprusiato, inhibidores de prostglandina, suramina, bloqueantes de serotonina, esteroides, inhibidores de tioproteasa, triazolpirimidina (un antagonista de PDGF) y óxido nítrico. Es un ejemplo de agente antialérgico permirolast de potasio. Otras sustancias o agentes terapéuticos que pueden ser apropiados incluyen interferón α , células epiteliales genomanipuladas, anticuerpos tales como anticuerpo CD-34, abciximab (REOPRO) y anticuerpo de captura de células progenitoras, fármacos promotores de la curación que promueven la proliferación controlada de células musculares con una composición normal y fisiológicamente benigna y productos de síntesis, enzimas, agentes antiinflamatorios, antivíricos, fármacos anticancerosos, agentes anticoagulantes, secuestrantes de radicales libres, agentes antiinflamatorios esteroideos, agentes antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos,

donantes de óxido nítrico, superóxido dismutasas, miméticos de superóxido dismutasas, 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo (4-amino-TEMPO), dexametasona, clobetasol, aspirina, profármacos de los mismos, cofármacos de los mismos y una combinación de los mismos. Las sustancias anteriores se enumeran a modo de ejemplo y no se pretende que sean limitantes. Son igualmente aplicables otros agentes activos que están actualmente disponibles o que pueden desarrollarse en el futuro.

La presente invención se refiere también a un kit para tratar un trastorno vascular, que comprende una primera composición farmacéutica que comprende un inhibidor de MRP4 y una segunda composición farmacéutica que comprende uno o más inhibidores de fosfodiesterasa (PDE) seleccionados del grupo consistente en inhibidores de PDE3, inhibidores de PDE4, inhibidores de PDE5 y mezclas de los mismos.

10 **Biomateriales:**

La presente invención se refiere también al uso de un inhibidor de MRP4 para la preparación de biomateriales o dispositivos de suministro médico seleccionados de entre prótesis endovasculares tales como endoprótesis vasculares, injertos de derivación, parches internos alrededor del tubo vascular, parches externos alrededor del tubo vascular, manguito vascular y catéter de angioplastia.

15 A este respecto, la invención se refiere más particularmente a biomateriales o dispositivos de suministro médicos como se mencionan anteriormente, recubiertos con un inhibidor de la expresión y/o actividad de MRP4 tal como se define anteriormente, estando seleccionados dichos biomateriales o dispositivos médicos de entre prótesis endovasculares tales como endoprótesis vasculares, injertos de derivación, parches internos alrededor del tubo vascular, parches externos alrededor del tubo vascular, manguito vascular y catéter de angioplastia. Dicho
20 biomaterial local o dispositivo de suministro médico puede usarse para reducir la estenosis o reestenosis como auxiliar de procedimientos de revascularización, derivación o injerto efectuados en cualquier localización vascular, incluyendo arterias coronarias, arterias carótidas, arterias renales, arterias periféricas, arterias cerebrales o cualquier otra localización arterial o venosa, para reducir la estenosis anastomótica tal como en el caso de acceso a diálisis arteriovenosa con o sin injerto de politetrafluoroetileno y con o sin endoprótesis vascular, o junto con cualquier otro
25 procedimiento cardiaco o de transplante, o intervenciones vasculares congénitas.

Con fines de ilustración, dichas prótesis endovasculares y métodos para el recubrimiento de inhibidor selectivo sobre las mismas se describen más particularmente en el documento WO2005094916, o son aquellas usadas actualmente en la técnica. Los compuestos usados para el recubrimiento de prótesis deberían permitir preferiblemente una liberación controlada de dicho inhibidor. Dichos compuestos podrían ser polímeros (tales como suturas, policarbonato, Hydron y Elvax), biopolímeros/biomatrices (tales como alginato, fucanos, matrices basadas en colágeno, sulfato de heparano) o compuestos sintéticos tales como moléculas de tipo sulfato de heparano sintéticas o combinaciones de los mismos (Davies, *et al.*, 1997; Desgranges, *et al.*, 2001; Dixit, *et al.*, 2001; Ishihara, *et al.*, 2001; Letourneur, *et al.*, 2002; Tanihara, *et al.*, 2001; Tassiopoulos y Greisler, 2000). Otros ejemplos de materiales poliméricos pueden incluir materiales degradables biocompatibles, por ejemplo, poliésteres basados en lactona; ortopolíesteres, por ejemplo, polilactida; poli(lactida-glicolida); poli(caprolactona-glicolida); poliortoésteres; polianhídridos; poliaminoácidos; polisacáridos; polifosfacenos; copolímeros de poli(eteréster), por ejemplo, PEO-PLLA, o mezclas de los mismos y materiales no degradables biocompatibles, por ejemplo, polidimetilsiloxano; poli(etileno-acetato de vinilo); polímeros o copolímeros basados en acrilato, por ejemplo, poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de hidroxietilmetilo); polivinilpirrolidina; polímeros fluorados tales como politetrafluoroetileno y ésteres de celulosa. Cuando se usa una matriz polimérica, puede comprender 2 capas, por ejemplo, una capa básica en que se incorpora dicho inhibidor, tal como etileno-co-acetato de vinilo y poli(metacrilato de butilo) y un recubrimiento superior tal como poli(metacrilato de butilo), que actúa como control de la difusión de dicho inhibidor. Como alternativa, dicho inhibidor puede estar incluido en la capa básica y el auxiliar puede incorporarse a la capa externa o viceversa.

45 Dicho biomaterial o dispositivo de suministro médico puede ser biodegradable o puede estar compuesto por un metal o aleación, por ejemplo Ni y Ti, u otra sustancia estable cuando se pretenda para uso permanente. El inhibidor de la invención puede estar también retenido en el metal de la endoprótesis vascular o cuerpo de injerto que se ha modificado para contener microporos o canales. Pueden usarse también para suministro local parches internos alrededor del tubo vascular, parches externos alrededor del tubo vascular o un manguito vascular compuesto por polímero u otro material biocompatible como se da a conocer anteriormente que contienen el inhibidor de la invención.

Dicho biomaterial o dispositivo de suministro médico permite que el inhibidor se libere de dicho biomaterial o dispositivo de suministro médico con el tiempo y entre en el tejido circundante. Dicha liberación puede aparecer durante 1 mes a 1 año. El suministro local según la presente invención permite una alta concentración del inhibidor de la invención en el sitio enfermo con baja concentración de compuesto en circulación. La cantidad de dicho inhibidor usada para dichas aplicaciones de suministro local variará dependiendo de los compuestos usados, la afección para tratar y el efecto deseado. Con fines de la invención, se administrará una cantidad terapéuticamente eficaz.

La administración local de dicho biomaterial o dispositivo de suministro médico tiene lugar preferiblemente en o cerca de los sitios de lesiones vasculares. La administración puede ser mediante una o más de las siguientes vías: mediante catéter u otro sistema de suministro intravascular, por vía intranasal, intrabronquial, interperitoneal o esofágica. Las endoprótesis vasculares se usan comúnmente como estructura tubular dejada dentro de la luz de un conducto para aliviar una obstrucción. Pueden insertarse en la luz del conducto en forma no expandida y expandirse entonces autónomamente (endoprótesis vasculares autoexpansibles) o con la ayuda de un segundo dispositivo *in situ*, por ejemplo, un balón de angioplastia montado en catéter que se infla dentro del vaso o canal corporal estenosado para cizallar y desestabilizar las obstrucciones asociadas a los componentes de pared del vaso y obtener una luz ensanchada.

El biomaterial de la invención puede recubrirse con cualquier otro compuesto como se describe anteriormente para composiciones farmacéuticas, incluyendo inhibidores de PDE3, PDE4 y/o PDE5.

La invención se ilustrará adicionalmente vistas las siguientes figuras y ejemplos.

FIGURAS

Figura 1: Expresión de MRP4 en células de músculo liso arterial coronario humano (hCASMC). (a) PCR-TI representativa que muestra la detección de ARNm de MRP4 y β -actina en hCASMC cultivadas, (b) análisis de inmunofluorescencia de la expresión de MRP4 en hCASMC transfectadas con ARNm de MRP4 usando un anticuerpo policlonal contra MRP4 purificado por afinidad, (c) análisis de transferencia Western de la expresión de MRP4 y caveolina 1 en membranas de hCASMC purificadas en un gradiente discontinuo de sacarosa, que muestra que está presente MRP4 en las fracciones enriquecidas en caveolina 1.

Figura 2: Regulación positiva de MRP4 *in vitro* e *in vivo* en células de músculo liso proliferantes. (a) Se cuantificó la expresión de MRP4 mediante transferencia Western en hCASMC cultivadas expuestas durante 72 horas a 5% o 0,1% de S. Se usa PP2B (calcineurina) como patrón y ciclina D1 como marcador de proliferación. (**: $p < 0,01$). (b) Secciones representativas de arterias carótidas de rata lesionadas por globo el día 14 después de la lesión. La inmunotinción reveló una expresión predominante de MRP4 en la neoíntima (ni) en comparación con la media (m). La expresión de MRP4 (rojo) se correlacionaba con la de NM-B (verde), un marcador fenotípico de la proliferación de células de músculo liso.

Figura 3: Efectos antiproliferativos de AMPc y GMPc e inhibidores de MRP en hCASMC. Se midió la proliferación celular 72 horas después de sembrar mediante la incorporación de BrdU y se expresó como un aumento relativo en comparación con células con falta de suplemento de crecimiento (0,1% de S). (a) Proliferación celular en presencia de los nucleótidos cíclicos permeantes 8-Br-AMPc (100 μ M) y 8-Br-GMPc (200 μ M), SNP (un donante de NO, 1 mM) y forskolina (FSK, un estimulante de la actividad adenilato ciclasa, 5 μ M), $n = 3$ experimentos por triplicado. (b) Efecto de la dosis de inhibidores de MRP y PDE (DIP: dipiridamol, IBMX, MK571 y NBMPR) sobre la proliferación de hCASMC, $n = 3$ experimentos por triplicado. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Figura 4: Inhibición de la proliferación de hCASMC usando ARNip de MRP4: (a) análisis de transferencia Western de lisados celulares totales de hCASMC transfectadas durante 72 h con ARNip de MRP4 o ARNip desorganizado que muestra un silenciamiento eficaz de MRP4. Se incubaron las proteínas con anticuerpo anti-MRP4 o anticuerpos anti-PP2B (calcineurina). Se usa calcineurina como control de carga, $n = 3$; $P \leq 0,001$. (b) Efecto de ARNip de MRP4 y MRP5 sobre la proliferación de hCASMCs (evaluado por la incorporación de BrdU) en comparación con ARNip desorganizado, $n = 5$ experimentos por triplicado; *** $p \leq 0,001$ para MRP4 en comparación con desorganizado o MRP5. (c) Tinción con hematoxilina-eosina representativa de arterias carótidas no lesionadas (NI) y lesionadas 14 días después de la cirugía. (d) Datos promedio de la relación de grosor de íntima/media de los 3 grupos anteriores (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ comparados con infectadas con Ad-shLuc). m indica media; ni, neoíntima; ad, adventicia. ($n = 5$ para carótida no lesionada, $n = 4$ para infectada con Ad-shLuc y $n = 6$ para infectada con Ad-shMRP4). (e) PCR en arterias carótidas: se extrajo ADN de carótidas de rata y se ensayó la expresión adenovírica por PCR.

Figura 5: Efecto de ARNip de MRP4 sobre los niveles celulares de AMPc y GMPc: Niveles de la relación intracelular/extracelular de (a) AMPc o (b) GMPc en hCASMC transfectadas con ARNip de MRP4 o desorganizado durante 72 h y medido mediante inmunoensayo enzimático competitivo específico (** $p < 0,01$; $n = 3$). (c, d) Efecto de la forskolina superfundida a concentraciones crecientes (de 0,5 μ M a 100 μ M) sobre el AMPc intracelular medido mediante el sensor Epac2-camps basado en FRET en dos hCASMC representativas transfectadas con ARNip desorganizados (c) o de MRP4 (d). Se reseñan las imágenes brutas obtenidas tras excitación de CFP a 440 ± 20 nm en ambas células y el curso temporal de la correspondiente relación de CFP/YFP corregida promediada a célula. La fluorescencia de CFP e YFP indicaba que Epac2-camps se localiza principalmente en el citosol de ambas células. En la célula transfectada con ARNip desorganizado (c), la aplicación de forskolina 5 μ M proporcionaba una elevación de AMPc reflejada por el aumento de la relación de CFP/YFP basal. En las células transfectadas con ARNip de MRP4 (d), concentraciones de forskolina tan bajas como 0,5 μ M daban ya como resultado un aumento significativo de AMPc. (e) Curva de respuesta a la concentración (escala logarítmica) de las medidas de FRET en hCASMCs transfectadas con ARNip de MRP4 ($n = 11$) o ARNip desorganizado ($n = 12$) e infectadas transitoriamente con Epac2-camps. La relación de CFP/YFP basal era similar en ambos grupos de células. Las líneas continuas son ajustes de

los puntos de datos según la ecuación de Hill (véase Métodos). La interferencia de ARN de MRP4 en hCASC MC daba como resultado un desplazamiento a la izquierda de la curva de respuesta a la concentración de forskolina, como indicaban los valores de CE_{50} significativamente diferentes obtenidos para el fármaco en los dos grupos de experimentos.

5 **Figura 6: La inhibición de MRP4 puede potenciar el efecto de AMPc, pero no de GMPc, sobre la proliferación de hCASC MC.** Efecto antiproliferativo dependiente de la dosis en células transfectadas durante 72 horas con ARNip de MRP4 o desorganizado de (a) el activador de la señalización de AMPc foscolina, o (b) el activador de la señalización de GMPc SNP (n= 5). (c, d) Evaluación de la proliferación de hCASC MC en células transfectadas con ARNip de MRP4 o desorganizado (c) o tratadas con los inhibidores de MRP NMBPR (100 μ M) y MK571 (37,5 μ M) (d) en presencia de inhibidores específicos de PKA o PKG. Se observó en ambos casos una reversión del efecto de inhibición de MRP4 sobre la proliferación de hCASC MC en presencia de Ad-PKI (un inhibidor específico de PKA) pero no de KT5823 (un inhibidor específico de PKG), n=3 por grupo, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001. (e) Transferencia Western representativa y evaluación cuantitativa de CREB fosforilado (pCREB) en hCASC MC proliferantes transfectadas con ARNip de MRP4 o desorganizado (n= 3, **p < 0,01). (f) Evaluación cuantitativa de la actividad del elemento sensible a AMPc CRE medida por el informador luciferasa, CRE-Luc en hCASC MC proliferantes transfectadas con ARNip desorganizado o de MRP4 (n= 3, **p < 0,01)

Figura 7: Esquema representativo de la implicación de MRP4 en el efecto antiproliferativo sobre las células de músculo liso de nucleótidos cíclicos.

20 **Figura 8. Tinción de MRP4 en tejido pulmonar.** Análisis de inmunofluorescencia de la expresión de MRP4 en arterias pulmonares humanas. (A) La inmunotinción en una arteria pulmonar normal revela expresión de MRP4 (rojo) en la media (verde: autofluorescencia). (B y C) En arterias pulmonares patológicas (de dos pacientes con hipertensión pulmonar), la inmunotinción muestra que se expresa MRP4 en media y neointima (B) o en media hipertrófica (C).

25 **Figura 9. Expresión de MRP4 en células de músculo liso aisladas de arterias pulmonares humanas.** Análisis de transferencia Western en células de músculo liso cultivadas expuestas durante 72 h a 0% de S o 5% de S, que muestran una expresión basal que aumenta en condiciones proliferativas.

Figura 10. Inhibición de la proliferación de hPASC MC (células de músculo liso de arteria pulmonar humana) con ARNip de MRP4. El efecto de ARNip de MRP4 sobre la proliferación celular (valorado por la incorporación de BrDU) en comparación con ARNip desorganizado muestra una reducción significativa.

30 **Figura S1: Expresión de MRP5 y MRP4 en hCASC MC.** (a) Detección de ARNm de MRP5 y β -actina en hCASC MC usando PCR-TI. (b) Análisis de transferencia Western de la expresión de MRP4 y MRP5 en lisados totales (1) y de membrana (2). (c) Detección por inmunofluorescencia de MRP5 en arteria coronaria humana que muestra expresión predominante en la capa endotelial.

35 **Figure S2: Expresión de MRP4 en arteria coronaria humana.** Sección representativa de una arteria coronaria humana explantada con cardiomiopatía isquémica teñida con MRP4 y NM-B, un marcador del fenotipo sintético/proliferativo de células de músculo liso.

Figura S3: Evaluación de la eficacia silenciadora de ARNip. PCR instantánea cuantitativa con cebadores específicos de gen de MRP4 (a) o MRP5 (b) sobre hCASC MC transfectadas durante 72 h con ARNip de MRP4, MRP5 o desorganizado (n= 3, ***p < 0,001).

40 **Figura S4. ARNhc de MRP4 adenovirico:** (a) Mapa del vector Ad-shMRP4 y de la secuencia de ARNhc de MRP4. (b, c) PCR instantánea cuantitativa (b) y transferencia Western (c) en células de músculo liso de rata transfectadas durante 72 h con Ad-shMRP4 o Ad-shLuc (n= 3, ***p < 0,001). Se usaron virus a una multiplicidad de infección (MOI) de 30.

45 **Figura S5: El silenciamiento de MRP4 no está asociado a la apoptosis en hCA5MC.** Se transfectaron ARNip de MRP4 o desorganizado en hCASC MC durante 72 h y se analizó la apoptosis por tinción TUNEL (ApopTag Red, Serologicals Corp). Para el control positivo, se trataron las células con estaurosporina (10 μ M) durante 1 h.

EJEMPLO

Resumen

50 Los nucleótidos cíclicos se degradan por fosfodiesterasas específicas y se postula que se eliminan mediante transportadores de eflujo activo, a saber las proteínas multifarmacorresistentes MRP4 y MRP5. Para estudiar el papel de MRP4/5 en la señalización de señal se usaron, como modelo, células de músculo liso arterial. Se mostró que MRP4, pero no MRP5, se regulaba positivamente durante la proliferación de células de músculo liso arterial *in vivo* e *in vitro*. La inhibición de MRP4 daba como resultado un aumento significativo de los niveles intracelulares de AMPc y GMPc y era suficiente para bloquear la proliferación y prevenir el crecimiento de neointima en arterias carótidas de rata lesionadas. El efecto antiproliferativo de la inhibición de MRP4 está relacionado con la activación

de la ruta PKA/CREB. Se proporcionan las primeras evidencias de que MRP4 actúa como regulador endógeno independiente de los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos, y se identifica la inhibición de MRP4 como un nuevo modo de prevenir las enfermedades proliferativas de músculo liso vascular.

Introducción

5 El monofosfato de guanosina cíclico (AMPc) y el monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) son segundos mensajeros que retransmiten señales externas a proteínas efectoras clave posteriores. Las dianas más comunes son proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG), que regulan un gran número de procesos fosforilando las proteínas diana, pero AMPc y GMPc ejercen también su función uniéndose a ciertos canales iónicos¹ y proteínas de intercambio². Los eventos de señalización en respuesta a la estimulación extracelular surgen por una ingeniosa regulación de los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos resultante de un equilibrio entre su producción y su eliminación. Clásicamente, la eliminación de nucleótidos cíclicos se ha ligado con la hidrólisis mediada por fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDE). Las PDE constituyen una gran superfamilia de enzimas codificadas por varios genes con expresión específica de tejido de un gran número de variantes de corte y empalme³. En varios modelos que incluyen células de músculo liso vascular, se ha mostrado que las PDE regulan la amplitud y duración de la señalización intracelular de nucleótidos cíclicos⁴. Por ejemplo, el sildenafil, un inhibidor de PDE5 selectivo usado para tratar disfunción eréctil humana mediante la elevación de la disponibilidad de GMPc, desactiva múltiples rutas de señalización asociadas a la hipertrofia cardíaca⁵ (las rutas de señalización de calcineurina/NFAT, PI3K/Akt y ERK1/2) y la proliferación de células de músculo liso vascular con cierto éxito terapéutico en el tratamiento de hipertensión arterial pulmonar^{5,6}. Sin embargo, la falta de inhibidores específicos de isoforma o variante y la compartimentalización de la señalización de nucleótidos cíclicos⁴ representa niveles adicionales de complejidad para conseguir efectos terapéuticos selectivos. Además, no se sabe bien si las PDE pueden representar el único regulador de las rutas de nucleótidos cíclicos.

Se ha encontrado que la proteína asociada a multifarmacorresistencia MRP4 (*ABCC4*), un miembro de la gran familia de proteínas transmembrana (familia de transportadores de módulo de unión a ATP de clase C), implicada en el transporte activo de sustratos fuera de las células, efluye activamente análogos de monofosfato de nucleósido de células de mamífero⁷. Se ha mostrado entonces que MRP4 y MRP5 (*ABCC5*), otro miembro de la familia de ABCC, funcionan como transportadores dependientes de energía para AMPc y GMPc^{8,9}. Se ha reseñado la expresión de MRP4 y MRP5 en varios tejidos, incluyendo células de músculo liso¹⁰⁻¹², pero su función fisiológica permanece incierta. Especialmente, no era aún conocido si la eliminación directa de nucleótidos cíclicos por estos transportadores puede ser un mecanismo adicional o alternativo que actúa previamente al catabolismo de nucleótidos cíclicos.

Para precisar la función de MRP4/5 en procesos biológicos dependientes de nucleótidos cíclicos, se usaron células de músculo liso arterial, ya que los aumentos de niveles de nucleótidos cíclicos tienen un papel bien establecido en la inducción de la relajación de células de músculo liso contráctiles/en reposo por un lado y en la inhibición de la proliferación de células de músculo liso sintéticas/activadas por otro lado³. Se analizaron la expresión y función de MRP4/5 *in vitro* e *in vivo*. Se proporciona la primera evidencia de que MRP4 actúa como regulador endógeno independiente de los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos, limitando por tanto la activación de la transducción de señal mediada. Los resultados identifican entonces la inhibición de MRP4 como un nuevo modo de potenciar esta ruta de señalización.

40 Resultados

La MRP4 se expresa en células de músculo liso arterial coronario.

Se analizó primero la expresión de MRP4 y MRP5 en cultivo primario de células de músculo liso arterial coronario humano (hCASM). Mediante PCR-TI, se detectaron ARNm de MRP4 y MRP5 en hCASM (Fig. 1a y Fig 1a suplementaria). El análisis de inmunofluorescencia de hCASM transfectadas con MRP4 demuestra una localización predominante en membrana plasmática de la proteína (Fig. 1b). Mediante inmunotransferencia, se detectó la proteína MRP4 de 160 kDa esperada tanto en extractos celulares totales como en preparaciones de membrana de células de músculo liso, mientras que la proteína MRP5 se detectó solo en fracciones enriquecidas en membrana (Fig. 1b suplementaria). La MRP5 estaba presente en la capa endotelial de la arteria coronaria (Fig. 1c suplementaria). Se investigó adicionalmente la localización de MRP4 separando proteínas de células de músculo liso en un gradiente discontinuo de sacarosa de 5 a 40%. Como se muestra en la Fig. 1c, la expresión de la proteína MRP4 de 160 kDa estaba restringida a las fracciones de baja densidad, donde se expresaba la proteína caveolina 1 asociada a balsa.

Regulación positiva de MRP4 en células de músculo liso arterial proliferantes

Se examinó la expresión de MRP4 y MRP5 mediante transferencia Western en hCASM en reposo (0,1% de suplemento S) y proliferantes estimuladas con 5% de S. Se detectó un aumento de la expresión de MRP4 ($3,7 \pm 0,42$, $p = 0,01$, Fig. 2a) pero no de MRP5 (datos no mostrados) en el cultivo de hCASM. Esta sobreexpresión se correlacionaba con la expresión de ciclina D1, un marcador de la proliferación de células de músculo liso (Fig. 2a). Para determinar la importancia de este aumento *in vivo*, se analizó la distribución de MRP4 en arterias carótidas de

rata después de lesión de globo, un modelo bien caracterizado de proliferación de células de músculo liso. Como se muestra en la Fig. 2b, las células de músculo liso altamente proliferativas en la neointima exhibían una fuerte expresión de proteína MRP4, mientras que la expresión de MRP4 en la media era limitada. Se encontró una sobreexpresión similar de MRP4 en hCASC proliferantes en arterias coronarias ateroscleróticas (Fig. 2 suplementaria). En ambos modelos, la expresión de MRP4 estaba correlacionada con la de NM-B, un marcador del cambio de fenotipo en reposo a proliferativo de las células de músculo liso (Fig. 2b y Fig. 2 suplementaria). Globalmente, estos datos indican que la MRP4 se expresa a bajo nivel en células de músculo liso arterial en reposo y se regula positivamente en respuesta a estímulos proliferativos.

La inhibición farmacológica de MRP inhibe la proliferación de células de músculo liso

En primer lugar, se comprobó la influencia de AMPc y GMPc sobre el crecimiento de hCASC en el modelo. El tratamiento de hCASC con 8-bromo-AMPc permeante (100 μ M) o con el activador de adenilato ciclasa forskolina (5 μ M) dio como resultado una inhibición significativa de la proliferación inducida por suero (Fig. 3a, $p < 0,001$). Se observaron resultados similares usando 8-bromo-GMPc (200 μ M) ($p = 0,001$) o el donante de NO SNP (1 mM) ($p < 0,001$), confirmando el efecto antiproliferativo ya descrito de los nucleótidos cíclicos en células de músculo liso vascular (Fig. 3a). Para definir el papel de MRP4 y MRP5 durante la proliferación de hCASC, se usaron entonces inhibidores farmacológicos de fosfodiesterasas y MRP (dipiridamol), de fosfodiesterasas pero no de MRP (IBMX) y de MRP4 y 5 (MK571) o de MRP4 (NBMPR) pero no de PDE. Se observó una inhibición de la proliferación de hCASC dependiente de la dosis cuando se trataban con cada fármaco (Fig. 3b). En ausencia de inhibidores, la estimulación con 5% de S aumentaba la proliferación de hCASC en $240 \pm 15,8\%$ en comparación con 0,1% de S. Este aumento se reducía significativamente de modo dependiente de la dosis por MK571 y NBMPR a $153 \pm 11\%$ ($p < 0,001$) y $140 \pm 15\%$ ($p < 0,001$), respectivamente, a la dosis máxima usada de estos inhibidores. Se redujo también la proliferación inducida por Supplement Mix por el inhibidor de PDE IBMX (IBMX 100 μ M: $170 \pm 12\%$; $p < 0,001$ en comparación con 5% de S), pero en menor extensión que la observada con inhibidores de MRP ($p < 0,04$ en comparación con MK571 37,5 μ M y $p = 0,007$ en comparación con NBMPR 100 μ M). Por otro lado, no se observó una diferencia significativa con el inhibidor global dipiridamol en comparación con MK571 o NBMPR. Estos datos indican que la inhibición de MRP puede inhibir la proliferación de hCASC, pero con mayor eficacia que la inhibición de PDE sola.

Inhibición de la proliferación de células de músculo liso arterial *in vitro* por ARN interferente pequeño de MRP4

Para investigar adicionalmente el papel de MRP4 y MRP5 en hCASC, se usó la estrategia de interferencia de ARN para silenciar específicamente la expresión de MRP4 y/o MRP5. Se diseñaron ARN interferentes pequeños contra MRP4 humana y se transfectaron en hCASC proporcionando, 72 horas después de la transfección, una reducción del ARNm de MRP4 de $75 \pm 1\%$ ($p < 0,001$) (Fig. 3 suplementaria) y del nivel de proteína de $74 \pm 6,8\%$ ($p < 0,001$) (Fig. 4a) en comparación con ARNip desorganizado. Se obtuvo una eficacia de silenciamiento similar para ARNip contra MRP5 humana (Fig. 3 suplementaria). La proliferación inducida por Supplement Mix era significativamente menor en hCASC transfectadas con ARNip de MRP4 que en aquellas infectadas con ARNip desorganizado (aumento relativo en comparación con 0,1% de S: $183 \pm 27\%$ y $313 \pm 35\%$ respectivamente, $p < 0,001$, Fig. 4b). Se obtuvieron resultados similares por ARNip de MRP4 diseñados y validados alternativamente (datos no mostrados). Además, el ARNip de MRP4 no estaba asociado a la apoptosis en hCASC (Fig. 5 suplementaria). Por otro lado, no se observó influencia de ARNip de MRP5 sobre la proliferación de hCASC (Fig. 4b), confirmando por tanto que la inhibición específica de MRP4 es suficiente para bloquear el crecimiento de hCASC.

Vectores adenovíricos que expresan ARNhc específico de previenen la formación de neointima *in vivo*

Para valorar el papel de la MRP4 en la prevención de la proliferación de células de músculo liso vascular *in vivo*, se infectaron arterias carótidas de rata lesionadas por globo usando un vector adenovírico que expresa un ARN de horquilla corto diseñado contra ARNm de MRP4 de rata (Ad-shMRP4). En primer lugar, se controló la eficacia de Ad-shMRP4 para silenciar la expresión de MRP4 *in vitro* en células de músculo liso arterial de rata. 72 horas después de la infección, los niveles de ARNm y proteína de MRP4 eran menores que los observados en células infectadas con el adenovirus que expresa ARNhc de luciferasa (Ad-shLuc) (Fig. 4 suplementaria).

2 semanas después de la lesión e infección con 10^{11} partículas de ADN de Ad-shMRP4 o Ad-shLuc, se sacrificaron las ratas y se efectuó un análisis morfométrico de las carótidas lesionadas en secciones transversales teñidas con hematoxilina/eosina (Fig. 4c). Se determinó el grado de reestenosis midiendo el grosor de íntima y media y calculando la relación de grosor de íntima/media (I/M). Las relaciones de I/M de arterias infectadas con Ad-shMRP4 eran significativamente menores que las de carótidas infectadas con Ad-shLuc ($p < 0,03$, Fig. 4d). Para comprobar la infección adenovírica, se extrajo ADN de carótidas de rata en cada muestra y se ensayó la expresión de adenovirus por PCR con cebadores específicos (Fig. 4e). Estos resultados muestran que reducir la actividad de MRP4 inhibe la proliferación de células de músculo liso vascular *in vitro* y también la formación de neointima inducida por lesión de globo *in vivo*.

La inhibición de MRP4 aumenta los niveles celulares de AMPc y GMPc

Las células transfectadas con ARNip de MRP4 exhibían un cambio significativo de los niveles de AMPc y GMPc con un marcado aumento de la relación intracelular/extracelular ($289 \pm 12,5\%$ y $230 \pm 5,5\%$ respectivamente en comparación con ARNip desorganizado), indicando una reducción del eflujo de nucleótidos cíclicos de hCASCs (Fig. 5a y 5b).

- 5 Para analizar adicionalmente la influencia de la inhibición de MRP4 sobre los niveles de AMPc, se infectaron hCASCs transfectadas con ARNip de MRP4 o desorganizado con un adenovirus que codifica Epac2-camps, un sensor basado en transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (FRET) para la formación de imágenes instantánea de AMPc en células vivas¹³, y se expusieron entonces a concentraciones crecientes de forskolina. Como se muestra en la Fig. 5c y d, la aplicación de forskolina a concentraciones crecientes desencadenaba una elevación de AMPc reflejada por el aumento de la relación de CFP/YFP que indica cambios de FRET entre CFP e YFP. Sin embargo, la estimulación con dosis menores de forskolina conducía a un mayor cambio de FRET en hCASCs transfectadas con ARNip de MRP4. Como se muestra en la Fig. 5e, el silenciamiento de MRP4 da como resultado un desplazamiento a la izquierda de la curva de respuesta a la concentración de forskolina, sin afectar al efecto máximo del fármaco. El ajuste de Hill de los datos indicaba que la dosis de forskolina que proporcionaba un 50% de la formación máxima de AMPc era significativamente menor en células transfectadas con ARNip de MRP4 que en células transfectadas con ARNip desorganizado (CE_{50} : $3,0 \pm 0,6 \mu\text{M}$ frente a $13,3 \pm 2,2 \mu\text{M}$, $p < 0,001$). Este resultado confirma una disponibilidad más rápida de AMPc en respuesta a la estimulación con adenilato ciclasa en células con inhibición de MRP4.

20 La inhibición de MRP4 potencia el efecto de AMPc sobre la proliferación de hCASCs activando la proteína cinasa A (PKA)

- En consonancia con los resultados previos, se observó que el efecto antiproliferativo dependiente de dosis de la forskolina se potenciaba significativamente en hCASCs transfectadas con ARNip de MRP4 en comparación con ARNip desorganizado (Fig. 6a). En células transfectadas con ARNip de MRP4, era suficiente una pequeña cantidad de forskolina para bloquear la proliferación de hCASCs: la constante de inhibición (K_i) se reducía de $0,79 \pm 0,56 \mu\text{M}$ en hCASCs transfectadas con ARNip desorganizado a $0,11 \pm 0,01 \mu\text{M}$ con ARNip de MRP4. No se observó un efecto similar usando el activador de GMPc SNP: la K_i era de $182 \pm 95 \mu\text{M}$ en células transfectadas con ARNip desorganizado y de $166 \pm 90 \mu\text{M}$ con ARNip de MRP4 (Fig. 6b).

- Estos resultados indican que la inhibición de MRP4 potencia el efecto de AMPc sobre la proliferación, pero no de GMPc. Se confirmó esto mostrando que el efecto inhibitorio de ARNip de MRP4 sobre la proliferación de hCASCs se revertía completamente mediante la inhibición de la proteína cinasa A (PKA) dependiente de AMPc por infección con Ad-PKI (un inhibidor específico de PKA), pero no mediante la inhibición de la proteína cinasa G (PKG) dependiente de GMPc usando el inhibidor farmacológico KT5823 (Fig. 6c). El efecto de los inhibidores farmacológicos de MRP4 MK571 y NMSPR sobre la proliferación de hCASCs se revertía también mediante la inhibición de PKA por infección con Ad-PKI pero no con KT5823 (Fig. 6d). Estos resultados muestran que la inhibición de MRP4 potencia el efecto de AMPc sobre la proliferación de hCASCs al activar la ruta de señalización dependiente de PKA.

- Debido a que la PKA regula la actividad y fosforilación de la proteína de unión al elemento sensible a AMP cíclico (CREB), y debido a que la CREB está implicada en la inhibición de la proliferación, se analizó el nivel de CREB fosforilada (pCREB) en hCASCs proliferantes transfectadas con ARNip desorganizado o ARNip de MRP4. El nivel de pCREB aumentaba un $329 \pm 15\%$ ($p = 0,003$) con la inhibición de MRP4, mientras que el nivel de CREB total era similar en ambas condiciones (Fig. 6e). Además, se midió la actividad de CREB en células transfectadas con un gen informador CRE-luciferasa. La actividad luciferasa aumentaba significativamente en células transfectadas con ARNip de MRP4 en comparación con ARNip desorganizado ($553 \pm 25\%$, $p < 0,01$, Fig. 6f). Por tanto, se concluyó que el efecto antiproliferativo de la inhibición de MRP4 está relacionado con la activación de la ruta de PKA/CREB.

MRP4 e hipertensión pulmonar

- 45 El análisis de inmunofluorescencia de la expresión de MRP4 en arterias pulmonares humanas revela la expresión de MRP4 en media y arteria pulmonar normal. En arterias pulmonares patológicas (de dos pacientes con hipertensión pulmonar), la inmunotinción muestra que se expresa MRP4 en media y neointima o en media hipertrófica (véase la Fig. 8). El análisis de transferencia Western en células de músculo liso cultivadas expuestas durante 72 h a 0% de S o 5% de S han mostrado una expresión basal de MRP4 en células de músculo liso aisladas de arterias pulmonares humanas que aumenta en condiciones proliferativas (véase la Fig. 9). El ARNip de MRP4 sobre la célula inhibe la proliferación de células de músculo liso arterial pulmonar humano (véase la Fig. 10).

Discusión

- Este estudio es el primero en identificar a MRP4, una bomba de eflujo dependiente de energía, como un modulador de la transducción de señal mediada por nucleótidos cíclicos en el sistema vascular. Los resultados indican que MRP4 actúa como regulador negativo que limita la amplitud de la señalización de nucleótidos cíclicos en células de músculo liso arterial. Este efecto está producido por el eflujo transmembrana activo de nucleótidos cíclicos fuera de las células, limitando por tanto la activación de la transducción de señal mediada. En células de músculo liso arterial, la inhibición específica de MRP4 modifica el contenido intracelular de nucleótidos cíclicos y por tanto permite una

potenciación drástica de su efecto antiproliferativo *in vitro* e *in vivo*. La inhibición de MRP4 es por tanto un nuevo enfoque atractivo para el tratamiento de trastornos vasculoproliferativos.

Hasta ahora, la MRP4 se ha considerado principalmente como un transportador fisiológico que media la exportación transmembrana de conjugados de glutatión, glucuronato y sulfatos endógenos o exógenos¹⁴. Por ejemplo, se espera que MRP4 sea un actor clave de la ruta de eliminación de urato¹⁵. Se ha reseñado también a MRP4 como un transportador activo de nucleótidos cíclicos¹⁶⁻¹⁸. Otros estudios han mostrado que MRP4 puede mediar el eflujo de análogos de nucleótidos purínicos antiviricos^{19,20} o anticancerosos¹⁶ y MRP4 está también implicada en el almacenamiento y liberación de ADP en gránulos densos de plaquetas²¹. Sin embargo, ninguno de estos estudios previos había identificado a MRP4 como un regulador previo de las rutas de señalización mediadas por nucleótidos cíclicos. Al usar inhibidores farmacológicos de MRP4 o inhabilitación de MRP4 mediada por interferencia de ARN en células de músculo liso, se observó un aumento significativo de los niveles intracelulares de AMPc y GMPc con una reducción concomitante de los niveles extracelulares en condiciones basales. En línea con estos resultados, la disponibilidad intracelular de AMPc después de estimulación por el activador de adenilato ciclasa forskolina^{22,23} se potenció drásticamente en células carentes de MRP4. Estos datos se obtuvieron sin inhibición de fosfodiesterasa, indicando que el contenido intracelular de nucleótidos cíclicos está determinado por dos mecanismos independientes: eflujo por MRP4 por un lado y catabolismo por PDE por otro lado (Fig. 7).

La inhibición de MRP4 estaba asociada a cambios tanto en los niveles de AMPc como de GMPc. Sin embargo, se observó que la inhibición de la proliferación inducida por suero estaba asociada a un aumento de la actividad de proteína cinasa A, porque añadir PKI (un inhibidor específico de proteína cinasa A) revertía completamente el efecto antiproliferativo de la inhibición de MRP4, mientras que el bloqueo de PKG no tenía efecto. El aumento de la fosforilación y actividad de CREB, una diana nuclear de la ruta de señalización de AMPc/PKA²⁴, está en línea con la activación de la ruta de PKA. Los efectos antiproliferativos específicos del tipo celular de AMPc y GMPc están bien documentados, aunque los mecanismos implicados siguen siendo imprecisos. En particular, se cree que los niveles aumentados de AMPc inhiben la proliferación de VSMC *in vitro* y reducen la formación de lesiones de neointima después de lesión arterial *in vivo*²⁵⁻²⁷. Esto está en línea con los resultados obtenidos en el mismo modelo *in vivo*, que muestra una prevención significativa de la formación de neointima usando un constructo adenovirico que expresa un ARN de horquilla corto específico contra MRP4. Por otro lado, se mostró también que GMPc inhibe la proliferación de VSMC en respuesta a mitógenos, aunque con menor eficacia que AMPc. La expresión de una PKG activa constitutivamente se ha reseñado como un modo de reducir la formación de neointima después de lesión por globo en ratas²⁸. No se observó recuperación del efecto inhibitorio de MRP4 después de la inhibición de la proteína cinasa G, un actor clave de la ruta de señalización de GMPc, suscitando preocupación sobre si la inhibición de MRP4 puede modular selectivamente la ruta de señalización de AMPc pero no de GMPc. Sin embargo, observaciones previas han sugerido que el GMPc puede actuar a través de PKA²⁹. En concordancia, se ha mostrado recientemente que el efecto antiproliferativo de GMPc puede estar ligado a la inhibición de la expresión de proteína 2 asociada a cinasa en fase S mediante la activación de proteína cinasa A³⁰. Es razonable que la GMPc no pueda activar de forma cruzada directamente PKA, sino que en lugar de ello aumente los niveles de AMPc inhibiendo la fosfodiesterasa 3 hidrolizante de AMPc como se muestra en células de músculo liso vascular proliferantes³¹. Además, los efectores intracelulares de AMPc y GMPc están compartimentalizados en complejos macromoleculares y MRP4 puede ser un copartícipe adicional de estos complejos. En los experimentos, MRP4 se localizaba en fracciones de membrana enriquecidas en caveolina. Las caveolas/balsas lipídicas son microdominios de membrana especializados en que los complejos multimoleculares de moléculas de señalización están compartimentalizados mediante interacción con caveolina¹³². La secuencia de proteína C-terminal de MRP4 contiene un motivo de unión al dominio PDZ consenso³³, sugiriendo que MRP4 podría interactuar estrechamente con otros copartícipes del complejo de señalización de membrana. Esto indica que MRP4 puede actuar en dominios subcelulares específicos y por tanto modula una etapa de activación inicial de la transducción de señal mediada por nucleótidos cíclicos.

Este estudio identificó a MRP4 como regulador de la proliferación de células de músculo liso. MRP4 se expresaba débilmente en células de músculo liso en reposo, pero se inducía su expresión en condiciones de proliferación *in vitro* e *in vivo*. Esto puede representar una realimentación positiva endógena después de la producción de nucleótidos cíclicos, pero los factores que regulan la expresión de MRP4 no son conocidos actualmente. Por tanto, MRP4 representa una diana especialmente prometedora ya que su expresión se correlaciona con una respuesta patológica de células de músculo liso. Esto indica que la MRP4 aumenta su importancia funcional durante la respuesta proliferativa de células de músculo liso. Esto está apoyado por la ausencia de defectos vasculares en ratones con desactivación génica de MRP4³⁴. En contraposición con estos resultados, estudios previos reseñaron la expresión de MRP5 en células de músculo liso humano^{10,12}, pero no buscaron MRP4. En este caso, MRP5 estaba presente a bajo nivel en células de músculo liso vascular. Sin embargo, es improbable que MRP5 comparta similitudes con MRP4 ya que no se observaron cambios de la expresión de MRP5 en modelos proliferativos de VSMC, y el silenciamiento eficaz de MRP5 no tuvo efecto sobre la proliferación de VSMC. Sin embargo, no puede excluirse que otras MRP estén implicadas en la extrusión de nucleótidos cíclicos, tales como MRP8³⁵.

Estos resultados apuntan a MRP4 como un mecanismo alternativo o complementario además de las fosfodiesterasas como moduladores de la homeostasis intracelular de nucleótidos cíclicos. Uno de los resultados más intrigantes es que la inhibición de MRP4 era suficiente *per se* para modular los niveles intracelulares de nucleótidos cíclicos y la transducción de señal mediada. Se observó también en experimentos *in vitro* que la reducción de la proliferación inducida por suero era mayor con inhibidores de MRP4 que con IBMX, un inhibidor de

fosfodiesterasa común. Es ahora bien conocido que las fosfodiesterasas se combinan en una organización espaciotemporal intracelular compleja⁴, controlando por tanto agrupamientos subcelulares específicos de nucleótidos cíclicos. Se ha reseñado también que algunas fosfodiesterasas pueden translocarse del citoplasma al núcleo en células de músculo liso proliferantes³⁶. En contraposición, la localización de MRP4 en fracciones enriquecidas en caveolina indica que MRP4 puede controlar de manera más estrecha el nivel de AMPc y GMPc neosintetizados^{37,38}. Si la MRP4 puede actuar como inactivador de la producción de nucleótidos cíclicos, mientras que las fosfodiesterasas regulan agrupamientos más específicos de nucleótidos cíclicos dentro de las células, merece investigaciones adicionales (Fig. 7).

Finalmente, la proliferación excesiva de células de músculo liso es un proceso fundamental que contribuye a la respuesta de lesión en vasos arteriales principales. Dicho proceso está implicado en numerosos trastornos vasculares, incluyendo aterosclerosis, reestenosis postangioplástica, hipertensión arterial pulmonar y enfermedad de injerto venoso^{39,40}. Se han usado varias estrategias para modular los niveles de AMPc y GMPc tales como la activación de adenilato/guanilato ciclasas o el uso de inhibidores farmacológicos de fosfodiesterasas. El uso creciente del inhibidor de PDE5A sildenafil en el tratamiento de trastornos vasculoproliferativos, tales como hipertensión pulmonar primaria, apoya este enfoque. El sildenafil se ha reseñado de forma interesante como inhibidor de MRP4⁴¹. Queda por determinar si su eficacia terapéutica podría ligarse a la inhibición de PDE5A o de MRP4 (o ambas).

En conclusión, los resultados implican que MRP4 es un regulador importante e independiente de la transducción de señal de AMPc y GMPc. La inhibición de MRP4 es por tanto una nueva estrategia terapéutica para limitar la proliferación de células de músculo liso, un mecanismo importante implicado en muchas afecciones patológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Se adquirió MK571 en Alexis Biochemicals. NBMPR, dipiridamol, IBMX, 8Br-AMPc, 8Br-GMPc, SNP y forskolina eran de Sigma Aldrich (Francia). El inhibidor de proteína cinasa KT5823 se adquirió en Calbiochem. El adenovirus PKI (Ad-PKI) se proporcionó por el Dr. Hazel Lum (University of Illinois, Chicago)⁴².

Todos los medios y sueros para el cultivo de VSMC humanas se adquirieron en PromoCell (PromoCell GmbH, Heidelberg, Alemania); los antibióticos se adquirieron en Invitrogen (Cergy Pontoise, Francia).

Muestras y cultivos humanos de células de músculo liso vascular humano

Se extirparon fragmentos de la arteria coronaria interventricular de corazones explantados. Después de su retirada, se sumergieron inmediatamente los fragmentos de arteria en disolución salina fisiológica, se pusieron a 4°C y se usaron a las pocas horas. Las células de músculo liso arterial coronario humano (hCASMC) se aislaron de la capa media mediante digestión enzimática. Después de la extirpación, se incubaron los fragmentos de media en medio basal de células de músculo liso 2 (SMCBM2, PromoCell) con colagenasa (CLS2, 50 U/ml, Worthington) y elastasa pancreática (0,25 mg/ml, Sigma) durante 4-6 horas a 37°C. Después de periodos de 30 minutos, se centrifugó la suspensión a 1000 rpm durante 3 minutos, se recogieron las células y se dispusieron en SMCBM2 + 20% de Supplement Mix (S) (PromoCell). Se desecharon las células obtenidas en el periodo de los primeros 20 minutos. Aquellas obtenidas en los demás ciclos se combinaron y cultivaron en SMCBM2 que contenía 5% de S y antibióticos a 37°C en 5% de CO₂. Las células se estudiaron entre los pases 2 y 6.

Lesión de la arteria carótida de rata

Se trataron los animales de acuerdo con las directrices institucionales. Se lesionó la arteria carótida externa izquierda de ratas Wistar macho adultas (CERJ, Francia) de 350 a 400 g de peso como se describe anteriormente⁴³. Dos semanas después de la cirugía, se recogieron las carótidas. Se midió la relación de grosor de íntima a media de secciones transversales teñidas con hematoxilina y toxina con un software informático (Lucia, Nikon). Se extrajo el ADN de carótidas lesionadas de rata usando procedimientos estándares (kit de purificación de ADN Puregene® de Gentra (EE.UU.)). Se ensayó entonces la expresión de adenovirus por PCR usando un cebador codificante orientado al módulo de expresión insertado (5'-TCTTGTGGAAAGGACGAGGA-3' (SEQ ID NO:10)) y un cebador anticodificante en el ADN antivírico (5'-ATCAAACGAGTTGGTGCTCA-3' (SEQ ID NO:11)).

PCR instantánea cuantitativa

Se preparó el ARN total usando el kit RNeasy Mini (Invitrogen) y se transcribió de forma inversa 1 µg usando un protocolo estándar. Se amplificó 1/10 del ADNc resultante mediante 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a la T_m (60°C para MRP4, MRP5 y RPL32) y 30 s a 72°C, seguido de una amplificación final a 72°C durante 10 min usando 1 unidad de ADN polimerasa BIOTAQ (Bioline) y 200 pmol de cada uno de los siguientes cebadores:

Cebador codificante de MRP4 humano: 5'-TGGTGCAGAAGGGGACTTAC-3' (SEQ ID NO:1) y cebador anticodificante: 5'-GCTCTCCAGAGCACCATCTT-3' (SEQ ID NO:2); cebador codificante de MRP5 humano: 5'-CTGGGCTTTTTCTGTATGA-3' (SEQ ID NO:3) y cebador anticodificante: 5'-TCTTGCCACAGTCTCTAGTCTT-

3' (SEQ ID NO:4); cebador codificante de RPL32 humano: 5'-GCCCAAGATCGTCAAAAAGA-3' (SEQ ID NO:5) y cebador anticodificante: 5'-GTCAATGCCTCTGGGTTT-3' (SEQ ID NO:6), cebador codificante de β -actina: 5'-CACCTTCTACAATGAGCTGTGCTTGC-3' (SEQ ID NO:12) y cebador anticodificante 5'-TGATCCACATCTGCTGGAAGGTGGACGTGTGGC-3' (SEQ ID NO:13).

- 5 Se usaron cebadores específicos de gen para amplificar ARNm por PCR en un aparato Mx4000 (Stratagene) usando la mezcla maestra Qiagen SYBR Green. Se monitorizó la especificidad de cada conjunto de cebadores mediante análisis de la curva de disociación. Se usó un volumen de muestra de 25 μ l para cada ensayo, que contenía una concentración final 1 x de mezcla maestra de PCR SYBR green, cebadores específicos de gen 400 nM y 5 μ l de molde.

10 Separación en gradiente de sacarosa y PAGE-SDS

- Se aislaron proteínas raspando las células en 2 ml de disolución de TNE (en mM): (Tris 20, NaCl 150, EDTA 1, pH 7,4) a la que se añadió un cóctel de inhibidores de proteasa (Sigma) y se homogeneizó entonces en hielo con un homogeneizador de vidrio. Se añadió entonces Triton X-100 a la fracción de proteína total con una concentración final de 1% para solubilizar las proteínas localizadas en la membrana plasmática bruta. Obsérvese que todas las etapas de la extracción de proteína se efectuaron a 4°C, a esta temperatura las balsas lipídicas son insolubles en Triton X-100 al 1%. Después de 30 minutos de incubación en hielo, se determinó la concentración de proteína usando un ensayo de proteína Bio-rad (Biorad Laboratories). Se dispusieron 2 ml de disolución de sacarosa al 80% en un tubo de centrifuga SW41 (Beckman), se dispusieron 2 ml de extracto total en la disolución de sacarosa y se mezcló la preparación. Se vertieron suavemente 4 ml de sacarosa al 35% en la mezcla, seguido de 4 ml de sacarosa al 5%. Se centrifugó entonces el gradiente durante 18 horas a 4000 rpm y 4°C, sin parar. Se recogieron fracciones de 1 ml desde la parte superior hasta la inferior del gradiente y se mantuvieron a -80°C. Se sometió a sonicación cada fracción de muestra, se cargaron 60 μ l en un gel de poliacrilamida-SDS al 12,5% y se analizaron por transferencia Western.

Análisis de transferencia Western e inmunofluorescencia

- 25 Se prepararon lisados celulares totales según el protocolo estándar (Upstate Biotechnology). Se aislaron proteínas de membrana raspando las células en tampón A (Tris/HCl 5 mmol/l, sacarosa 250 mmol/l y ácido etilendiaminotetraacético 0,1 mmol/l) suplementado con cóctel de inhibidores de proteasa (Sigma). Se centrifugó el lisado a 1000 g durante 10 min a 4°C y se centrifugó adicionalmente el sobrenadante a 100000 g durante 1 h a 4°C. Se resuspendió el sedimento resultante en tampón A. Se separaron las proteínas (50 μ g) por PAGE-SDS al 12% en membrana Hybond-C (Amersham Biosciences) y se incubaron con diversos anticuerpos. El anticuerpo anti-MRP4 se ha descrito anteriormente¹⁷. Otros anticuerpos eran: anticuerpo anti-MRP5 (1:250; Santa-Cruz Biotechnology), anti-caveolina 1 (1:5000, Abcam), anti-ciclina D1 (1:500, BD Biosciences), anti-PP2B (calcineurina) (1:250; BD Biosciences), anti-CREB (1:1000; Upstate Biotechnology), anti-CREB fosforilado (1:1000; Upstate Biotechnology). Las proteínas inmunorreactivas se visualizaron usando un sistema de detección ECL® (quimioluminiscencia potenciada) (Amersham Biosciences). Se cuantificó la densidad óptica usando software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MO). Para inmunofluorescencia, se incubaron las proteínas con anticuerpo anti-MRP4 o anti-NM-B (1:3000; Abcam) y se visualizaron usando anticuerpos secundarios conjugados directamente con Alexa-546 o Alexa-488 (Invitrogen).

Interferencia de ARN

- 40 Se diseñó específicamente el ARN silenciador contra MRP4 humana. Se diseñó específicamente la secuencia de ARNip para orientarse a varias variantes de corte y empalme de MRP4 (NM_005845, BC041560, AY081219, AF541977, AY133680, AY133679, AY133678). La secuencia codificante es 5'-CAGUGUUCUUACACUCCUTT-3' (SEQ ID NO:7) y la anticodificante: 5'-AGGAAGUGUAAGAACACUGTT-3' (SEQ ID NO:8). Para el segundo ARNip de MRP4, la secuencia orientada era 5'-CAAATGTGGATCCGAGAA-3'. El ARNip contra MRP5 humano se adquirió en Ambion (Cat: AM16810). Se usó un ARNip no silenciador sin homología con genes de mamífero (All Stars negative Control, Qiagen) como control negativo (ARNip desorganizado).

- Se transfectaron las células con ARNip (50 nM) en medio exento de suero durante un periodo de 6 h, se reemplazó entonces el medio por medio que contiene suero durante un periodo adicional de 66 h. Se efectuó la transfección usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) o electroporación usando la tecnología Amaxa® Nucleofector según las instrucciones del fabricante.

Construcción de Ad-shRNA

- Se diseñó específicamente ARNbc contra MRP4 de rata. Este ARNbc se orientará también a MRP4 humana. El ARNbc se reasoció y ligó por BamHI/EcoRI con el vector pSIREN usando sistemas de iARN Knockout (Clontech). Se transformó entonces el pSIREN en células *E. coli* usando células competentes Fusion-Blue (Clontech). Se cortó entonces el fragmento con PI-Sce I/I-Ceu I y se insertó en ADN vírico Adeno-X por PI-Sce I/I-Ceu I usando el sistema de expresión Adeno-X 1 (Clontech). Se transfectó el adenovirus resultante en células HEK293 y se propagó generando los AdV llamados Ad-shMRP4 (Fig. 4 suplementaria) y Ad-shLuc.

Para ensayar la eficacia del constructo adenovirico, se aislaron VSMC de las medias de aorta torácica de ratas Wistar macho y se cultivaron como se describe anteriormente⁴⁴.

Incorporación de bromodesoxiuridina a células de músculo liso

5 Se cultivaron células de músculo liso humano en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos durante 3 días en medio basal de células de músculo liso 2 suplementado con 5% de S. Se usó medio que contiene 0,1% de S para el control de detención del crecimiento. Se incubaron las células con agentes farmacológicos o ARNip durante 72 horas en medio que contiene 5% de S. Se añadió BrdU durante las últimas 16 horas. Se lavaron las placas de cultivo celular y se efectuó un ensayo colorimétrico de proliferación celular de BrdU según las instrucciones del fabricante (Roche).

Ensayos de GMP y AMP cíclicos

10 Se midieron GMP y AMP cíclicos en sobrenadantes de cultivo celular y en lisados celulares en hCASC transfectadas durante 72 h con ARNip desorganizados o ARNip de MRP4 mediante inmunoensayo enzimático competitivo como se describe por el fabricante (R&D Systems).

Transfección transitoria y ensayo de gen informador

15 Se cotransfectaron células con ARNip (50 nM) y el plásmido de gen informador CRE-luciferasa (Stratagene) mediante electroporación usando la tecnología Amaxa® Nucleofector según las instrucciones del fabricante. Después de un periodo de 6 h, se reemplazó el medio por medio que contiene suplemento. Se cultivaron las células en presencia 5% de S durante 66 h. Los resultados son medias de tres experimentos independientes efectuados por triplicado. Se midió la actividad luciferasa usando el "kit de ensayo de luciferasa" (Promega). Se expresó como porcentaje del control en unidades relativas de luciferasa.

Formación de imágenes de AMPc por transferencia de energía de resonancia de fluorescencia

20 Se transfectaron hCASC con ARNip desorganizado o ARNip contra MRP4 (cada uno a 50 nM) en medio exento de suplemento durante un periodo de 6 h antes de reemplazar el medio por medio que contiene suplemento. 24 h después de la transfección, se infectaron las células con un adenovirus que codifica el sensor de AMPc basado en FRET Epac2-camps. Este sensor de AMPc basado en FRET contiene un solo dominio de unión a AMPc de Epac2 fusionado con proteínas fluorescentes YFP y CFP. Tras la adición de forskolina, las concentraciones intracelulares crecientes de AMPc conducen a un cambio conformacional reversible de Epac2-camps que da como resultado una reducción de la FRET entre CFP e YFP, conduciendo a un aumento de la relación de CFP/YFP¹³. Se efectuaron experimentos de formación de imágenes a las 72 h a temperatura ambiente. Se mantuvieron las células en disolución K⁺-Ringer que contenía (en mmol/l): NaCl 121,6, KCl 5,4, MgCl₂ 1,8; CaCl₂ 1,8; NaHCO₃ 4, NaH₂PO₄ 0,8, D-glucosa 5, piruvato de sodio 5, HEPES 10, ajustado a pH 7,4. Se capturaron imágenes cada 5 s usando el objetivo de inmersión en aceite de 40x de un microscopio invertido Nikon TE 300 conectado con una cámara de carga acoplada (CCD) enfriada (Sensicam PE; PCO, Kelheim, Alemania) controlada por software (Metafluor, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.). Se excitó CFP durante 150-300 ms por una lámpara de xenón (100 W, Nikon, Champigny-sur-Marne, Francia) usando un filtro 440/20BP y un espejo dicroico 455LP. Se efectuó una formación de imágenes de emisión dual de CFP y YFP usando un separador de emisiones Optosplit II (Cairn Research, Faversham, RU) equipado con un espejo dicroico 495LP y filtros BP 470/30 y 535/30, respectivamente. Se midió la intensidad de fluorescencia media en una región de interés que comprende la célula entera. Se restó el fondo y se corrigió la intensidad de YFP por el desbordamiento de CFP en el canal de 535 nm antes de calcular la relación de CFP/YFP. Se obtuvieron imágenes de la relación con software ImageJ (National Institute of Health).

Aislamiento de MRP4 humana completa

40 Se aisló el ARN total de tejido humano usando reactivo TRIzol (Invitrogen) y se transcribió de forma inversa 1 µg usando un protocolo estándar. Para la amplificación de ADNc de MRP4, se diseñaron cebadores basándose en la secuencia humana publicada (nucleótidos 1 a 3979, número de acceso a GenBank (AF071202)). Se amplificó el décimo del ADNc resultante mediante 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C y 30 s a 72°C, seguido de una amplificación final a 72°C durante 10 minutos usando 1 unidad de ADN polimerasa BIOTAQ (Bioline) y 200 pmol de cada uno de los siguientes cebadores. Se clonó el fragmento resultante en el plásmido pIRES-GFP.

Análisis estadístico

50 Todos los datos cuantitativos se presentan como medias ± DE. Los análisis estadísticos se efectuaron usando el paquete de software Prism (GraphPad v3). Se usó el análisis de varianza unifactorial (ANOVA) para comparar cada parámetro. Se efectuaron comparaciones con prueba de *t post hoc* para identificar cuáles diferencias de grupo daban cuenta del ANOVA global significativo. Se ajustó a la ecuación de Hill la curva de respuesta a la concentración para el efecto de la forskolina sobre la relación de CFP/YFP normalizada (R): $R = E_{máx} / (1 + CE_{50}[forsc]^n)$, en que CE₅₀ es la concentración de fármaco requerida para producir una estimulación semimáxima, E_{máx} es el efecto máximo y n es el coeficiente de Hill. Las diferencias se consideraron significativas cuando *P* < 0,05.

55

REFERENCIAS

A lo largo de esta aplicación, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

- 5 Assender JW, Southgate KM, Hallett MB, Newby AC. "Inhibition of proliferation, but not of Ca²⁺ mobilization, by cyclic AMP and GMP in rabbit aortic smooth-muscle cells". Biochem. J. 1 de dic. de 1992; 288 (Pt 2): 527-32.
- Boerth NJ, Dey NB, Cornwell TL, Lincoln TM. "Cyclic GMP-dependent protein kinase regulates vascular smooth muscle cell phenotype". J. Vasc. Res., julio-agosto de 1997; 34(4): 245-59.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells". Science, 19 de abril de 2002; 296 (5567): 550-3.
- 10 Chen ZS, Lee K, Kruh GD. "Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine". J. Biol. Chem., 7 de sep. de 2001; 276(36): 33747-54, Epub de 10 de julio de 2001.
- Choi VW, Samulski RJ, McCarty DM. "Effects of adeno-associated virus DNA hairpin structure on recombination". J Virol. junio de 2005; 79(11): 6801-7.
- 15 Colas P, Cohen B, Jessen T, Grishina I, McCoy J, Brent R. (1996) "Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2". Nature, 380, 548-50.
- Cole *et al.*, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc., 1985, pág. 77-96).
- Cote RJ, Morrissey DM, Houghton AN, Beattie EJ Jr, Oettgen HF, Old LJ. "Generation of human monoclonal antibodies reactive with cellular antigens". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, abril de 1983; 80(7): 2026-30.
- 20 Desgranges P, Caruelle JP, Carpentier G, Barritault D, Tardieu M. "Beneficial use of fibroblast growth factor 2 and RGTA, a new family of heparan mimics, for endothelialization of PET prostheses". J. Biomed. Mater Res. 2001; 58(1): 1-9.
- Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. "Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies". Nat. Med. nov. de 2002; 8(11): 1249-56.
- 25 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells". Nature, 24 de mayo de 2001; 411 (6836): 494-8.
- Hannon GJ. "RNA interference". Nature, 11 de julio de 2002; 418(6894): 244-51.
- Jayasena S.D. (1999) "Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics". Clin. Chem. 45(9): 1628-50.
- 30 Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D. "The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides". J. Biol. Chem., 29 de sep. de 2000; 275(39): 30069-74.
- Kohler G, Milstein C. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity". Nature. 7 de agosto de 1975; 256(5517): 495-7.
- Kriegler, "A Laboratory Manual", W.H. Freeman C.O., Nueva York, 1990.
- 35 McDonald LJ, Murad F. "Nitric oxide and cyclic GMP signaling". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. enero de 1996; 211(1): 1-6.
- McManus MT, Sharp PA. "Gene silencing in mammals by small interfering RNAs". Nat. Rev. Genet., oct. de 2002; 3(10): 737-47.
- 40 Mitani A, Nakahara T, Sakamoto K, Ishii K. "Expression of multidrug resistance protein 4 and 5 in the porcine coronary and pulmonary arteries". Eur. J. Pharmacol., 11 de abril de 2003; 466(1-2): 223-4.
- Murry, "Methods in Molecular Biology," vol.7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J., 1991.
- Novak K. "Cardiovascular disease increasing in developing countries". Nat Med. sep. de 1998; 4(9): 989-90.
- Rybalkin SO, Van C, Bornfeldt KE, Beavo JA. "Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function". Circ Res., 22 de agosto de 2003; 93(4): 280-91. Revisión.

- Sinnaeve P, Chiche JD, Gillijns H, Van Pelt N, Wirthlin D, Van De Werf F, Collen D, Bloch KD, Janssens S. "Overexpression of a constitutively active protein kinase G mutant reduces neointima formation and in-stent restenosis". Circulation, 18 de junio de 2002; 105(24): 2911-6.
- 5 Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG. "Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases". Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1996; 36: 461-80.
- Tuerk C. and Gold L. (1990) "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase". Science, 3; 249(4968): 505-10.
- Tuschl T, Zamore PO, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. "Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro". Genes Dev., 15 de dic. de 1999; 13(24): 3191-7.
- 10 Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. "Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy". Mol. Ther., sep. de 2006; 14(3): 316-27, Epub de 7 de julio de 2006.
1. Kaupp, U.B. y Seifert, R. "Cyclic nucleotide-gated ion channels". Physiological reviews 82, 769-824 (2002).
 2. Rehmman, H., Wittinghofer, A. y Bos, J.L. "Capturing cyclic nucleotides in action: snapshots from crystallographic studies". Nature reviews 8, 63-73 (2007).
- 15 3. Rybalkin, S.D., Van, C., Bornfeldt, K.E. y Beavo, J.A. "Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function". Circulation research 93, 280-291 (2003).
4. Fischmeister, R., *et al.* "Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases". Circulation research 99, 816-828 (2006).
- 20 5. Takimoto, E., *et al.* "Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy". Nature medicine 11, 214-222 (2005).
6. Humbert, M., Sitbon, O. y Simonneau, G. "Treatment of pulmonary arterial hypertension". The New England journal of medicine 351, 1425-1436 (2004).
 7. Sampath, J., *et al.* "Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy". AAPS PharmSci. 4, E14 (2002).
- 25 8. Borst, P., de Wolf, C. y van de Wetering, K. "Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5". Pflugers Arch. 453, 661-673 (2007).
9. Ritter, C.A., *et al.* "Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5)". Drug metabolism reviews 37, 253-278 (2005).
 10. Dazert, P., *et al.* "Expression and localization of the multidrug resistance protein 5 (MRP5/ABCC5), a cellular export pump for cyclic nucleotides, in human heart". The American journal of pathology 163, 1567-1577 (2003).
- 30 11. Mitani, A., Nakahara, T., Sakamoto, K. e Ishii, K. "Expression of multidrug resistance protein 4 and 5 in the porcine coronary and pulmonary arteries". European journal of pharmacology 466, 223-224 (2003).
12. Nies, AT., Spring, H., Thon, W.F., Keppler, D. y Jedlitschky, G. "Immunolocalization of multidrug resistance protein 5 in the human genitourinary system". The Journal of urology 167, 2271-2275 (2002).
- 35 13. Nikolaev, V.O., Bunemann, M., Hein, L., Hannawacker, A. y Lohse, M.J. "Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation". The Journal of biological chemistry 279, 37215-37218 (2004).
14. Deeley, R.G., Westlake, C. y Cole, S.P. "Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins". Physiological reviews 86, 849-899 (2006).
- 40 15. Van Aubel, R.A., Smeets, P.H., van den Heuvel, J.J. y Russel, F.G. "Human organic anion transporter MRP4 (ABCC4) is an efflux pump for the purine end metabolite urate with multiple allosteric substrate binding sites", American journal of physiology 288, F327-333 (2005).
16. Chen, Z.S., Lee, K. y Kruh, G.D. "Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine". The Journal of biological chemistry 276, 33747-33754 (2001).
- 45 17. van Aubel, R.A., Smeets, P.H., Peters, J.G., Bindels, R.J. y Russel, F.G. "The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP". J. Am. Soc. Nephro. 13, 595-603 (2002).
18. Wielinga, P.R., *et al.* "Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells". The Journal of biological chemistry 278, 17664-17671 (2003).

19. Schuetz, J.D., *et al.* MRP4: "A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs". Nature medicine 5, 1048-1051 (1999).
20. Imaoka, T., *et al.* "Functional involvement of multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in the renal elimination of the antiviral drugs adefovir and tenofovir". Molecular pharmacology 71, 619-627 (2007).
- 5 21. Jedlitschky, G., *et al.* "The nucleotide transporter MRP4 (ABCC4) is highly expressed in human platelets and present in dense granules, indicating a role in mediator storage". Blood 104, 3603-3610 (2004).
22. McDonald, L.J. y Murad, F. "Nitric oxide and cyclic GMP signaling". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (Nueva York, N.Y 211, 1-6 (1996).
- 10 23. Sunahara, R.K., Dessauer, C.W. y Gilman, A.G. "Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases". Annual review of pharmacology and toxicology 36, 461-480 (1996).
24. Klemm, D.J., *et al.* "cAMP response element-binding protein content is a molecular determinant of smooth muscle cell proliferation and migration". The Journal of biological chemistry 276, 46132-46141 (2001).
25. Indolfi, C., *et al.* "Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury". Nature medicine 3, 775-779 (1997).
- 15 26. Assender, J.W., Southgate, K.M., Hallett, M.B. y Newby, A.C. "Inhibition of proliferation, but not of Ca²⁺ mobilization, by cyclic AMP and GMP in rabbit aortic smooth-muscle cells". The Biochemical journal 288 (Pt 2), 527-532 (1992).
27. Southgate, K. y Newby, A.C. "Serum-induced proliferation of rabbit aortic smooth muscle cells from the contractile state is inhibited by 8-Br-cAMP but not 8-Br-cGMP". Atherosclerosis 82, 113-123 (1990).
- 20 28. Sinnaeve, P., *et al.* "Overexpression of a constitutively active protein kinase G mutant reduces neointima formation and in-stent restenosis". Circulation 105, 2911-2916 (2002).
29. Cornwell, T.L., Arnold, E., Boerth, N.J. y Lincoln, T.M. "Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP". The American journal of physiology 267, C1405-1413 (1994).
- 25 30. Wu, Y.J., Bond, M., Sala-Newby, G.B. y Newby, A.C. "Altered S-phase kinase-associated protein-2 levels are a major mediator of cyclic nucleotide-induced inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation". Circulation research 98, 1141-1150 (2006).
31. Aizawa, T., *et al.* "Role of phosphodiesterase 3 in NO/cGMP-mediated antiinflammatory effects in vascular smooth muscle cells". Circulation research 93, 406-413 (2003).
- 30 32. Gratton, J.P., Bernatchez, P. y Sessa, W.C. "Caveolae and caveolins in the cardiovascular system". Circulation research 94, 1408-1417 (2004).
33. Russel, F.G., Masereeuw, R. y van Aubel, R.A. "Molecular aspects of renal anionic drug transport". Annual review of physiology 64, 563-594 (2002).
- 35 34. Leggas, M., *et al.* "Mrp4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy". Molecular and cellular biology 24, 7612-7621 (2004).
35. Guo, Y., *et al.* "MAP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenina". The Journal of biological chemistry 278, 29509-29514 (2003).
- 40 36. Nagel, D.J., *et al.* "Role of nuclear Ca²⁺/calmodulin-stimulated phosphodiesterase 1A in vascular smooth muscle cell growth and survival". Circulation research 98, 777-784 (2006).
37. Ostrom, R.S., *et al.* "Localization of adenylyl cyclase isoforms and G protein-coupled receptors in vascular smooth muscle cells: expression in caveolin-rich and noncaveolin domains". Molecular pharmacology 62, 983-992 (2002).
- 45 38. Linder, A.E., McCluskey, L.P., Cole, K.R., 3^o, Lanning, K.M. y Webb, R.C. "Dynamic association of nitric oxide downstream signaling molecules with endothelial caveolin-1 in rat aorta". The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 314, 9-15 (2005).
39. Dzau, V.J., Braun-Dullaeus, R.C. y Sedding, D.G. "Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies". Nature medicine 8, 1249-1256 (2002).
40. Novak, K. "Cardiovascular disease increasing in developing countries". Nature medicine 4, 989-990 (1998).

41. Reid, G., *et al.* "Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5". Molecular pharmacology 63, 1094-1103 (2003).
42. Lum, H., *et al.* "Expression of PKA inhibitor (PKI) gene abolishes cAMP-mediated protection to endothelial barrier dysfunction". The American journal of physiology 277, C580-588 (1999).
- 5 43. Lipskaia, L., *et al.* "Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene transfer reduces vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat". Circulation research 97, 488-495 (2005).
44. Vallot, O., *et al.* "Intracellular Ca(2+) handling in vascular smooth muscle cells is affected by proliferation". Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 20, 1225-1235 (2000).

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> INSERM
 <120> Inhibidores de MRP4 para el tratamiento de trastornos vasculares
 <130> BI007125

10 <160> 13
 <170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador
 <400> 1

25 tggcgcagaa ggggacttac 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> cebador
 <400> 2

35 gctctccaga gcaccatctt 20
 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> cebador
 <400> 3

45 ctgggccttt ttctgtatg a 21
 <210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> cebador
 <400> 4

55 tcttgccaca gtctctctag tctt 24
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> cebador

65

<400> 5
 gcccaagatc gtcaaaaaga 20

5 <210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 6
 gtcaatgcct ctgggttt 18

15 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> siARN

<400> 7
 caguguucuu acacuucut t 21

25 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> siARN

35 <400> 8
 aggaagugua agaacacugt t 21

40 <210> 9
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> shARN

<400> 9
 gcaaattgtgg atccgagaa 19

50 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> cebador

<400> 10
 tcttggtaa aggacgagga 20

60 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

65 <220>
 <223> cebador

ES 2 434 172 T3

<400> 11
atcaaacgag ttgggtctca 20

5 <210> 12
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> cebador

<400> 12
caccttctac aatgagctgt gcttgc 26

15 <210> 13
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

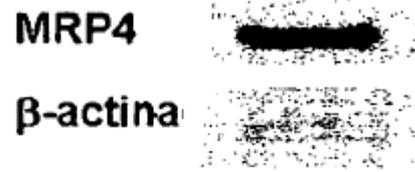
20 <220>
<223> cebador

<400> 13
25 tgatccacat ctgctggaag gttgacgtgt ggc 33

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de MRP4 para uso en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno vascular seleccionado del grupo consistente en aterosclerosis, reestenosis postangioplástica, hipertensión arterial pulmonar y enfermedad de injerto venoso, mediante la inhibición de la proliferación del crecimiento de células de músculo liso.
- 5 2. Un inhibidor para uso según la reivindicación 1, en el que el inhibidor es un inhibidor selectivo de MRP4.
3. Un inhibidor para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el inhibidor es un inhibidor de la expresión de MRP4.
- 10 4. El inhibidor para uso según la reivindicación 3, en el que dicho inhibidor de la expresión de MRP4 se selecciona del grupo consistente en moléculas de ARN o ADN anticodificantes, ARN inhibidores pequeños (ARNip), ARN de horquilla cortos y ribozimas.
5. El inhibidor para uso según la reivindicación 4, en el que dicho inhibidor de la expresión de MRP4 es un ARN de horquilla corto que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 9.
- 15 6. Un inhibidor para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho inhibidor de MRP4 se selecciona del grupo consistente en moléculas orgánicas pequeñas, aptámeros, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.
7. Una composición farmacéutica para uso para tratar un trastorno vascular según la reivindicación 1, que comprende un inhibidor de MRP4 como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 20 8. Una composición farmacéutica para uso según la reivindicación 7, que comprende adicionalmente uno o más inhibidores de fosfodiesterasa (PDE) seleccionados del grupo consistente en inhibidores de PDE3, inhibidores de PDE4, inhibidores de PDE5 y mezclas de los mismos.
9. Un kit para uso para tratar un trastorno vascular que comprende una primera composición farmacéutica según la reivindicación 7 y una segunda composición farmacéutica que comprende uno o más inhibidores de fosfodiesterasa (PDE) seleccionados del grupo consistente en inhibidores de PDE3, inhibidores de PDE4, inhibidores de PDE5 y mezclas de los mismos.
- 25 10. Un kit para uso según la reivindicación 9, en el que dicha segunda composición farmacéutica comprende un inhibidor de PDE5.

a



b



c

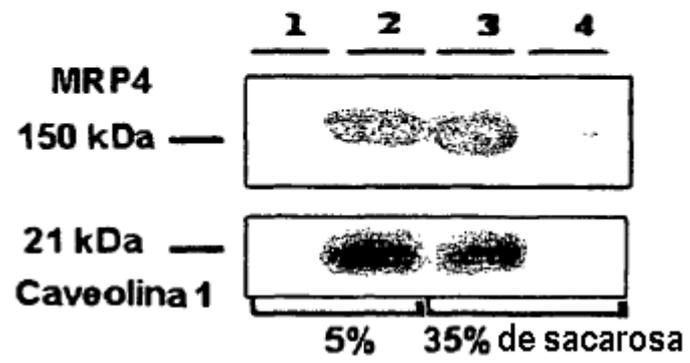


Figura 1

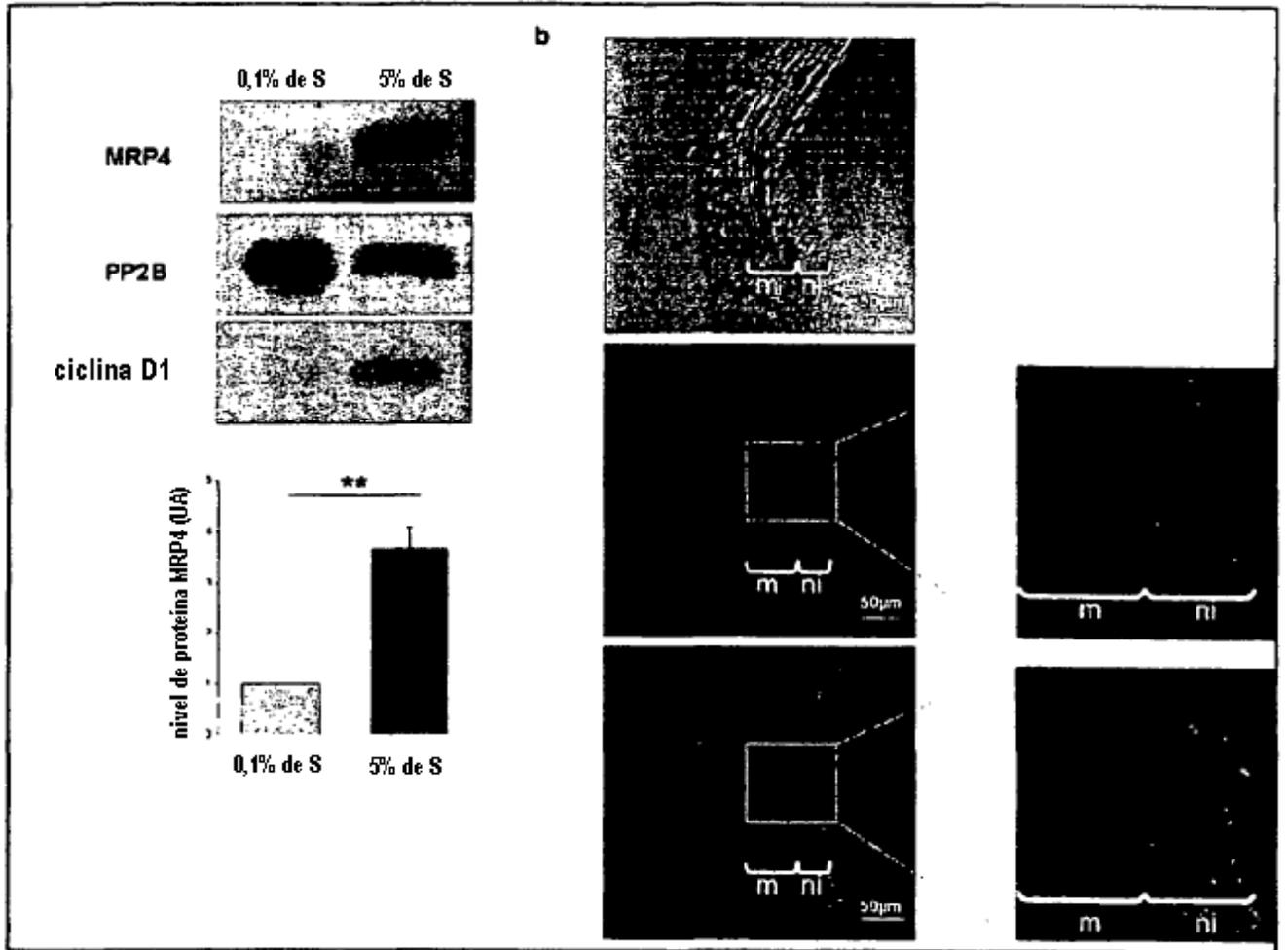


Figura 2

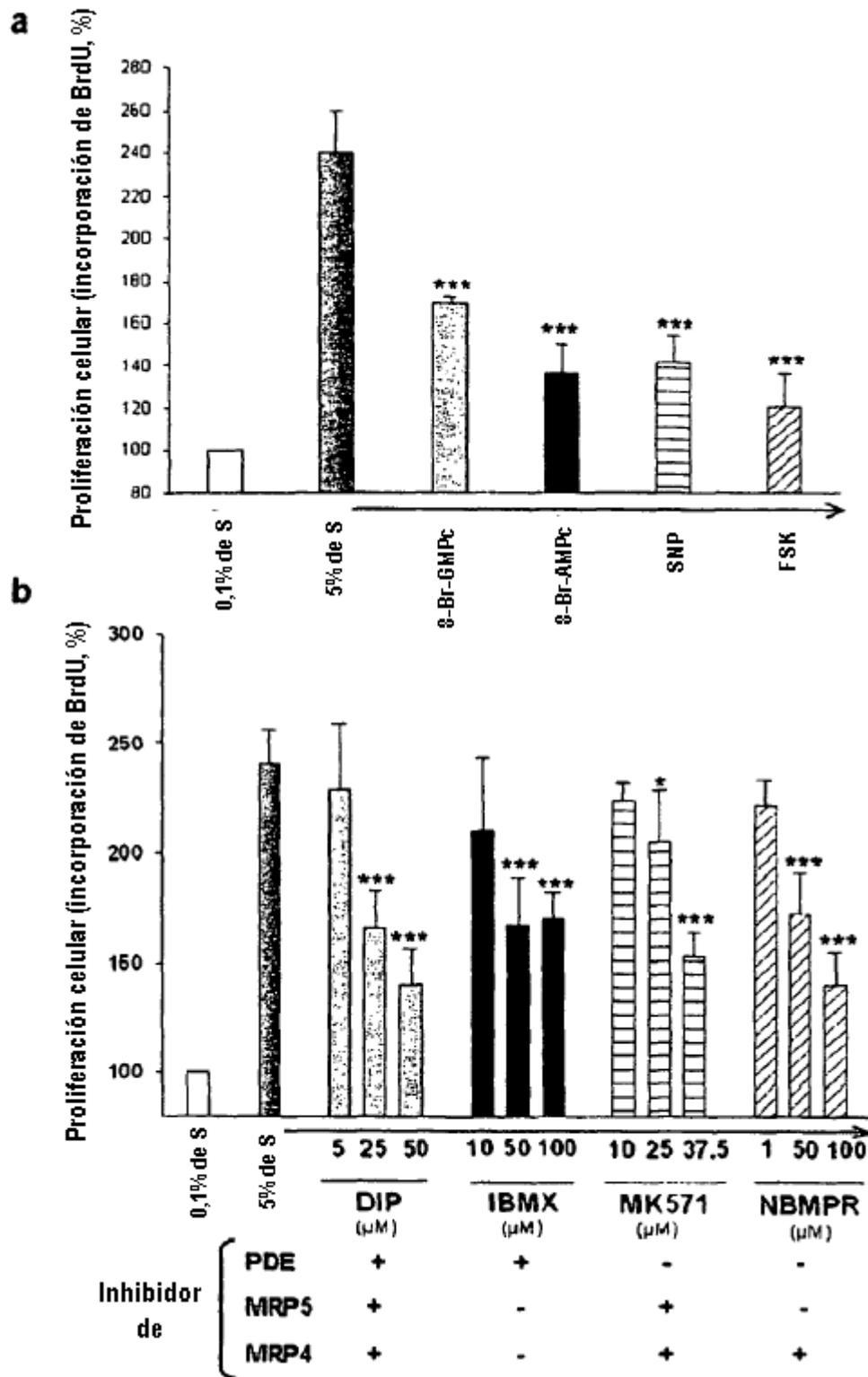


Figura 3

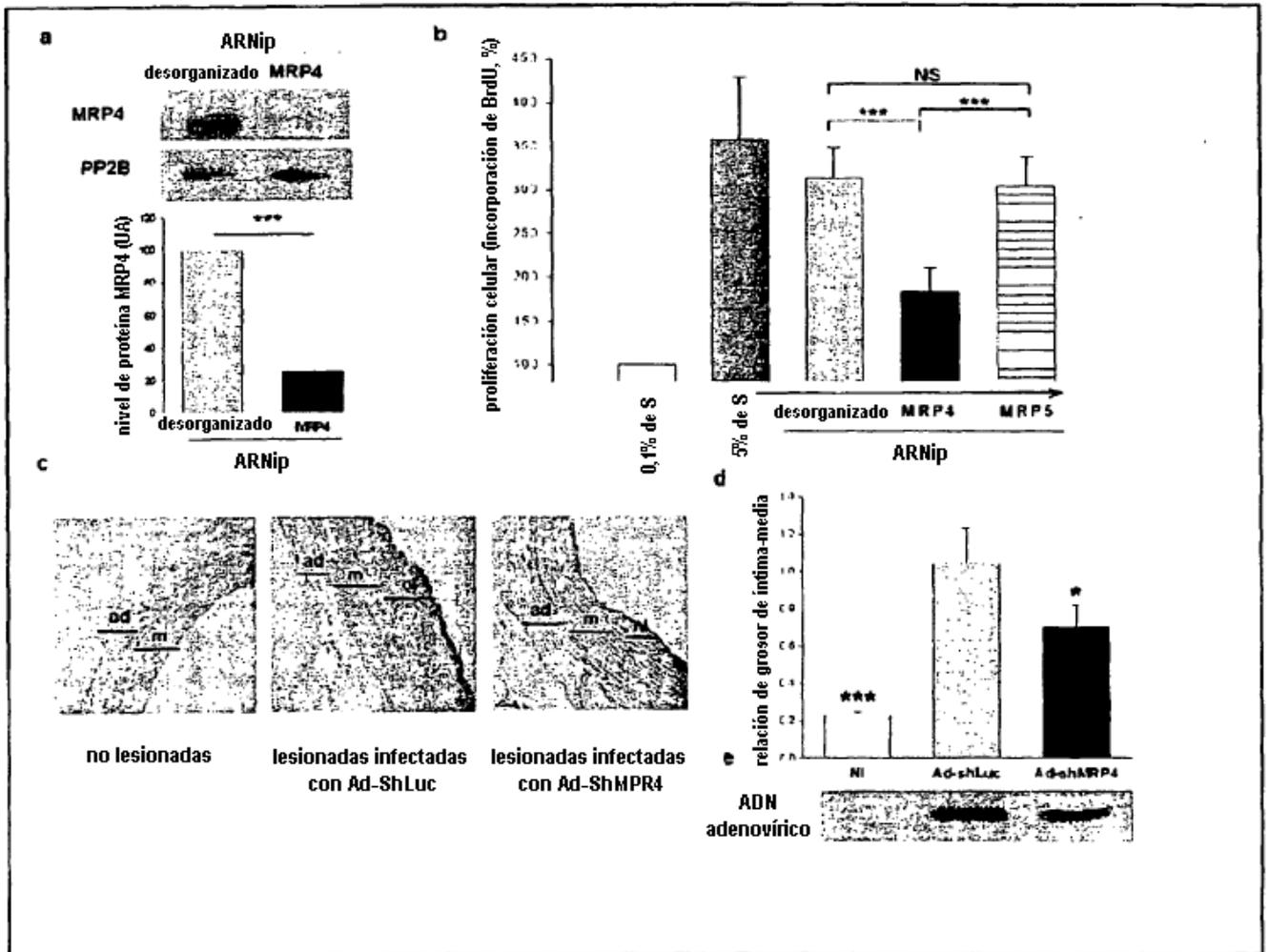


Figura 4

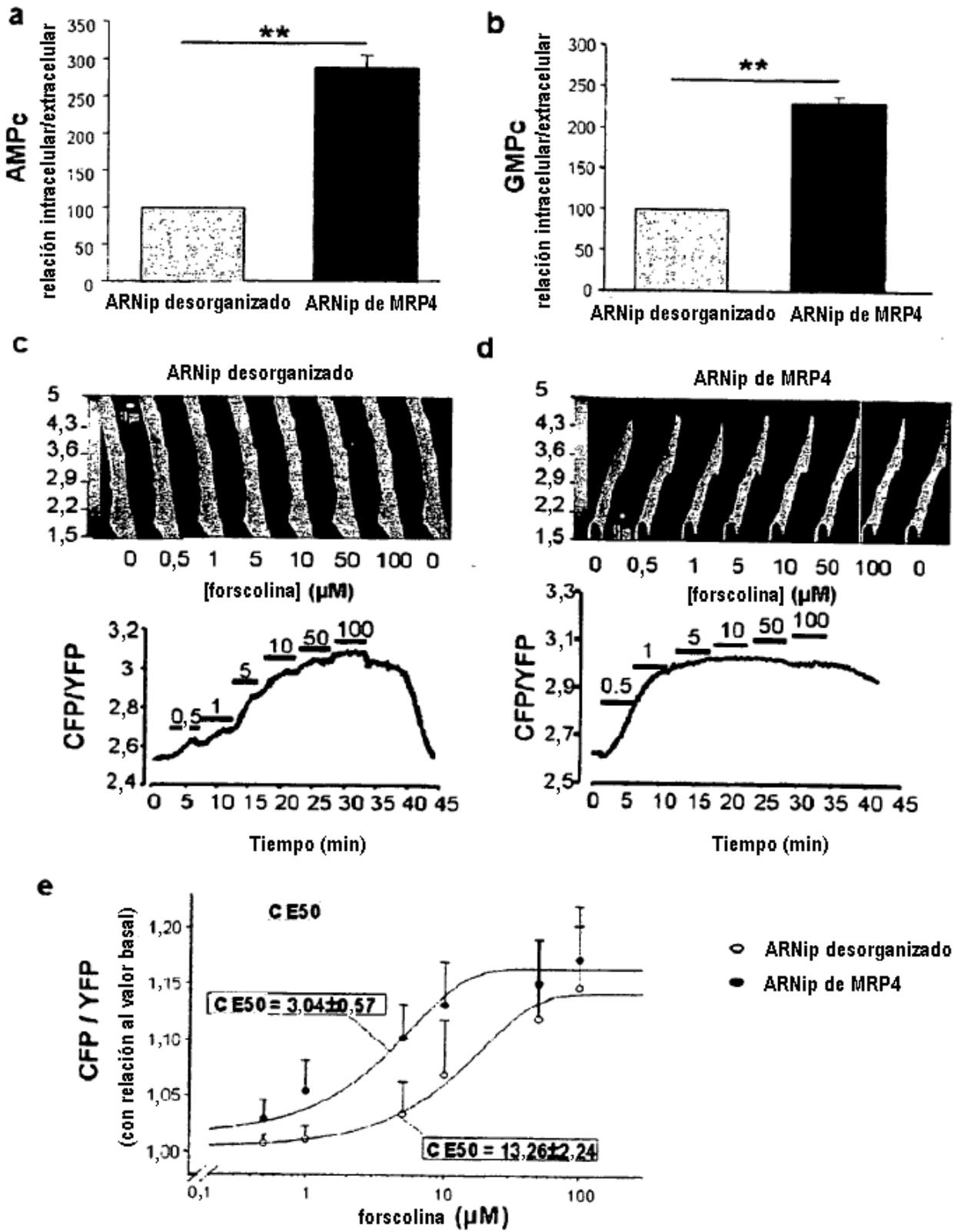


Figura 5

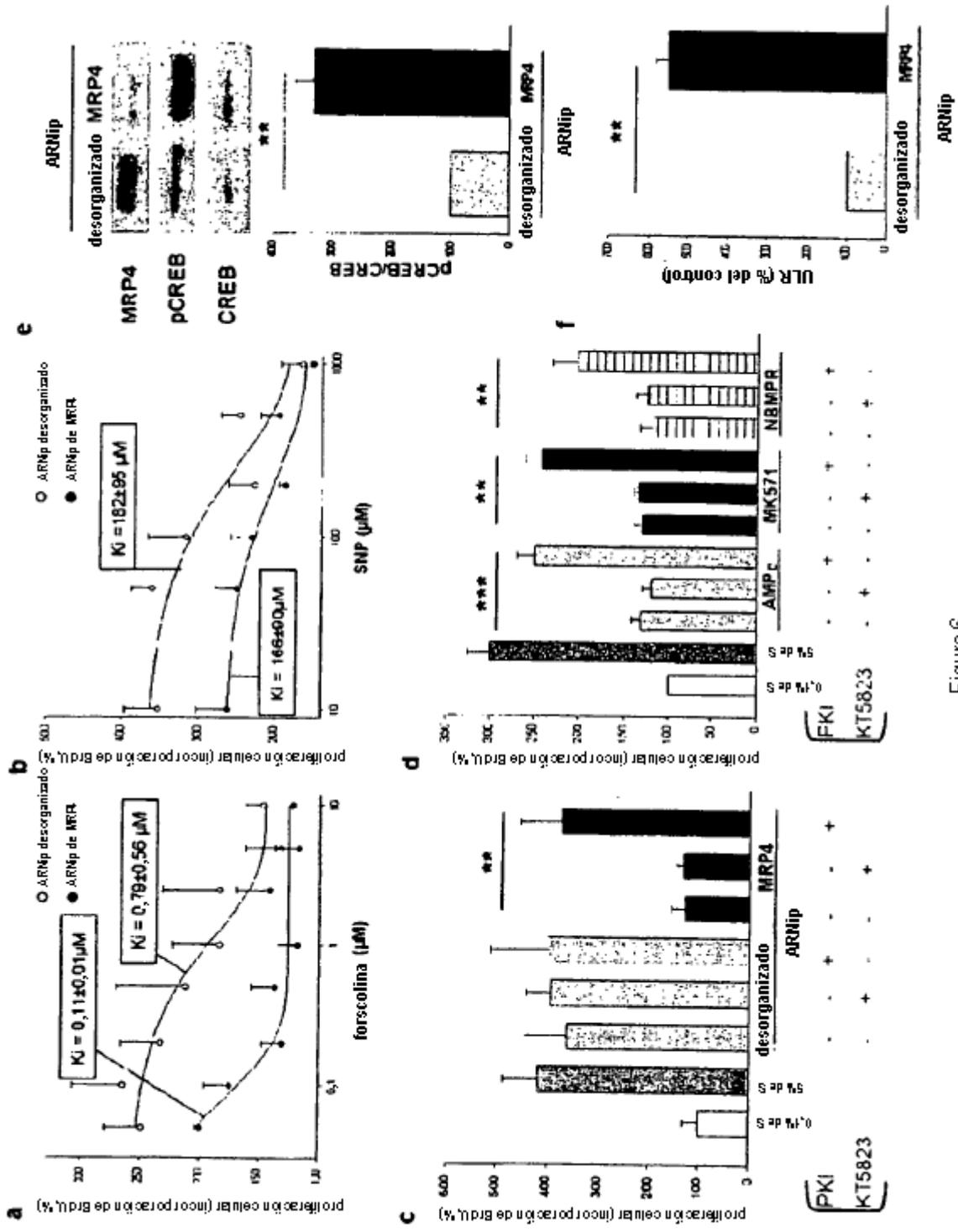


Figura 6

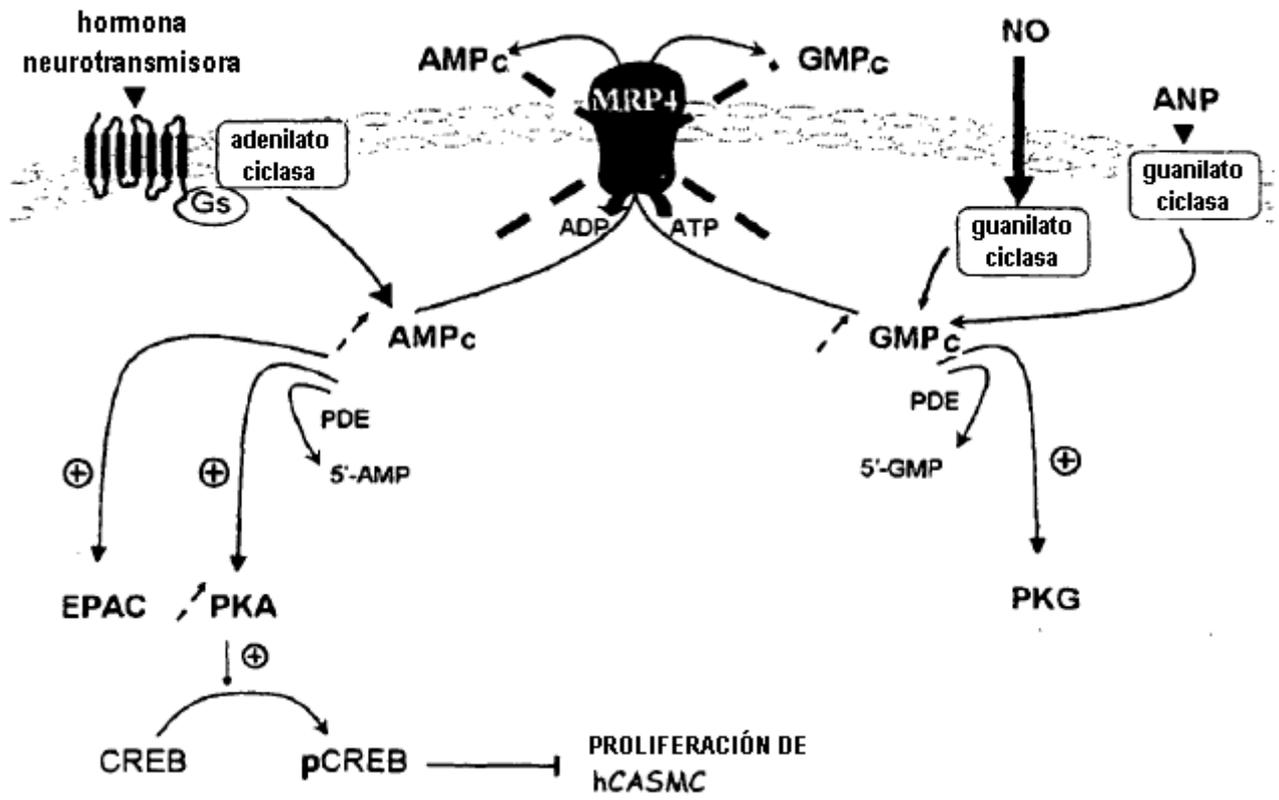


Figura 7

Figura 8

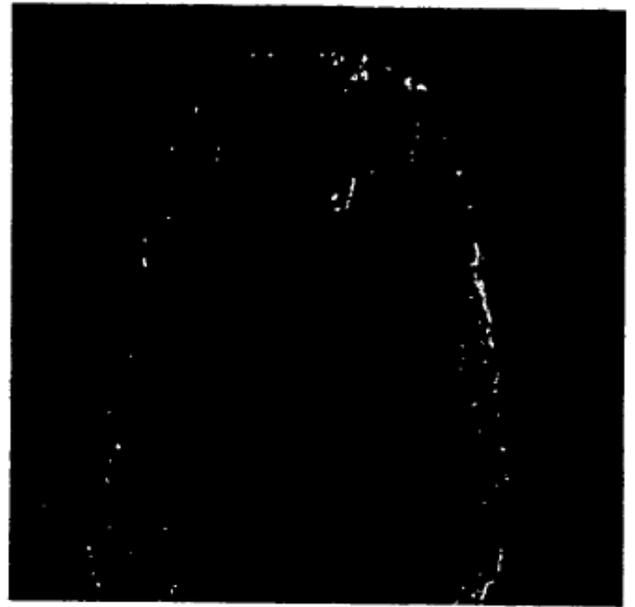
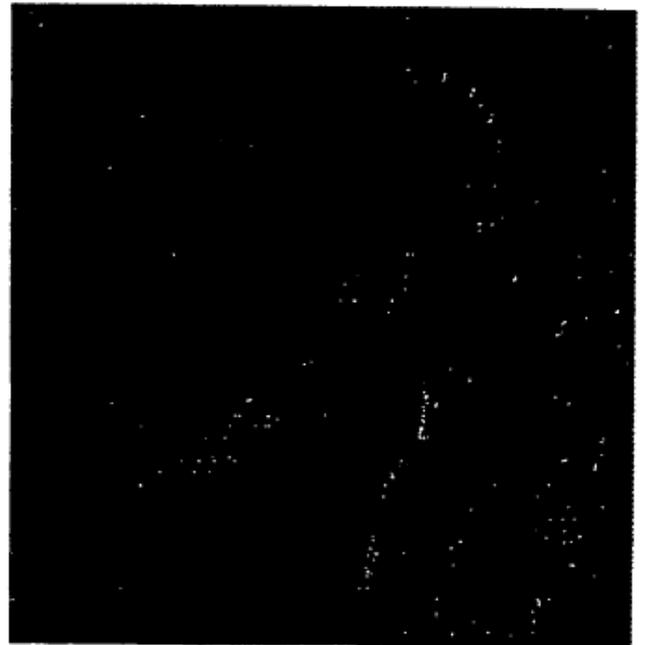
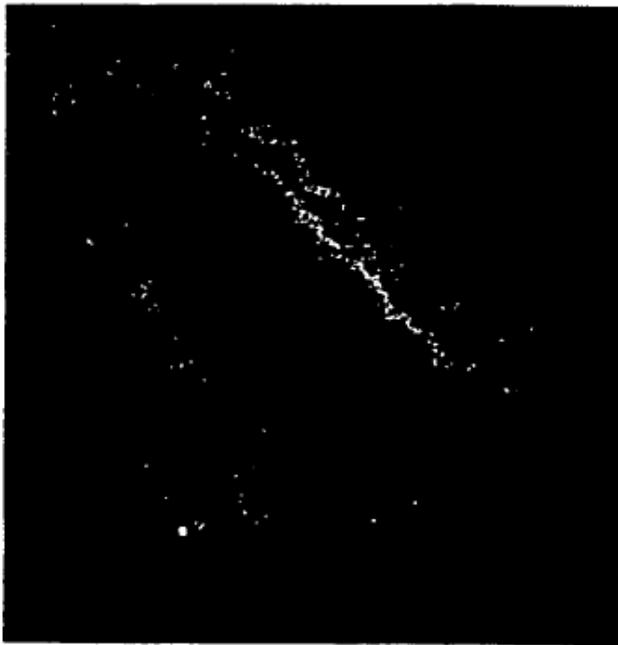


Figura 9

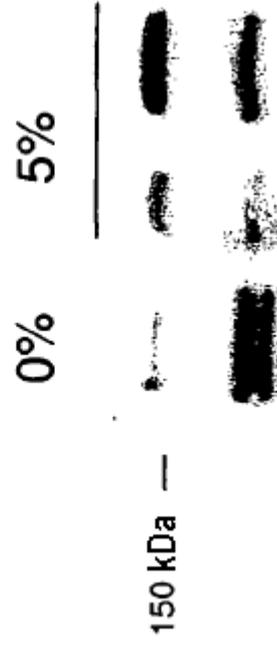
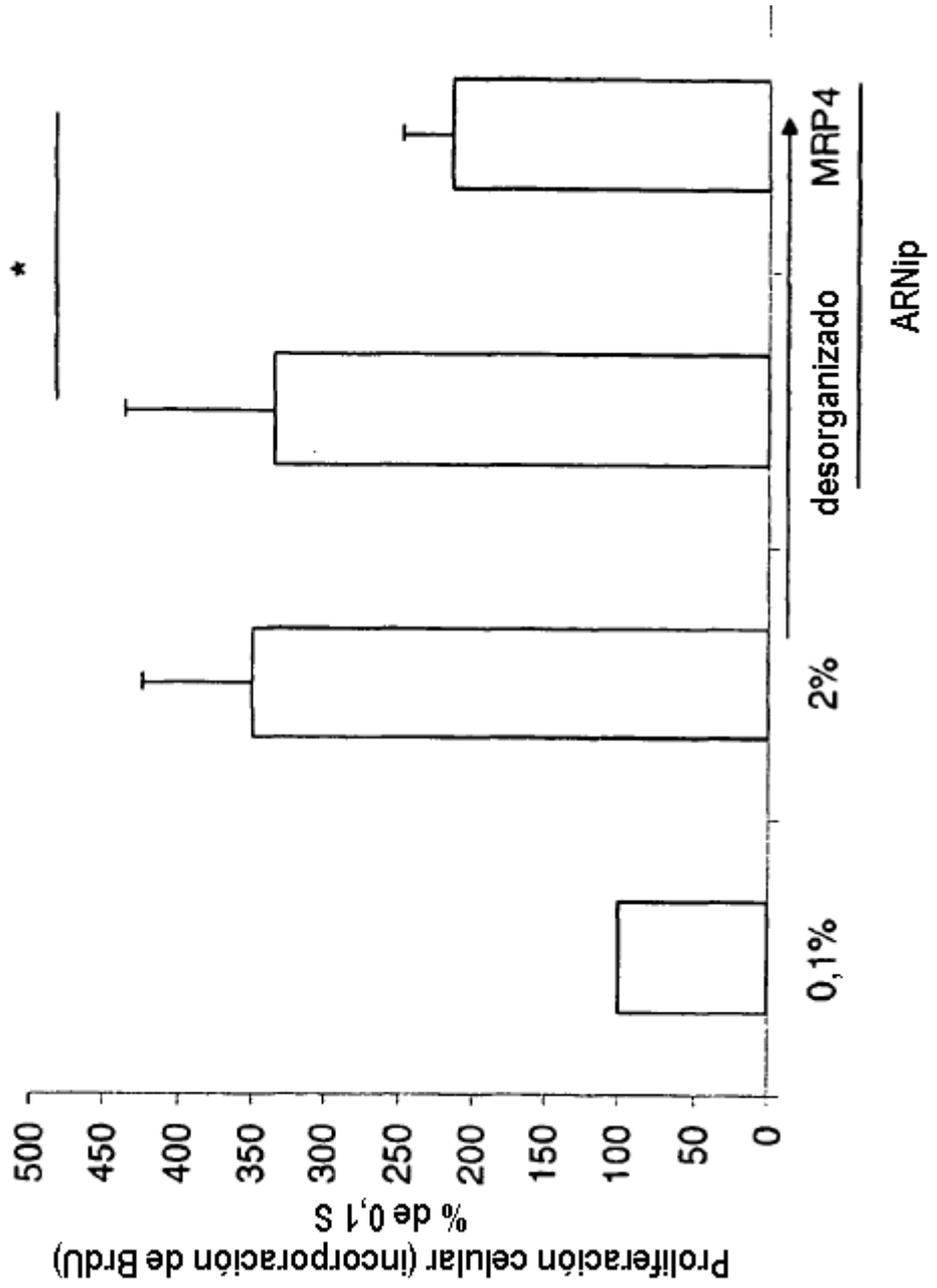


Figura 10



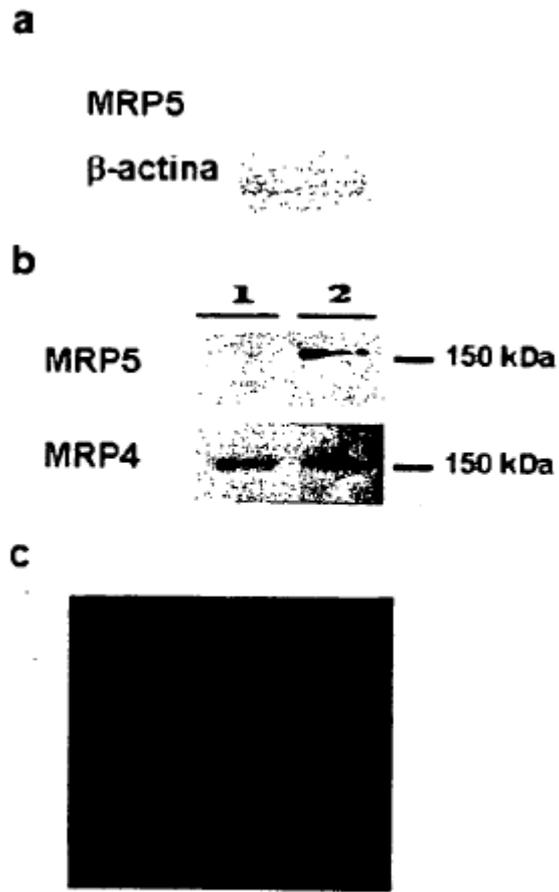


Figura 1 suplementaria

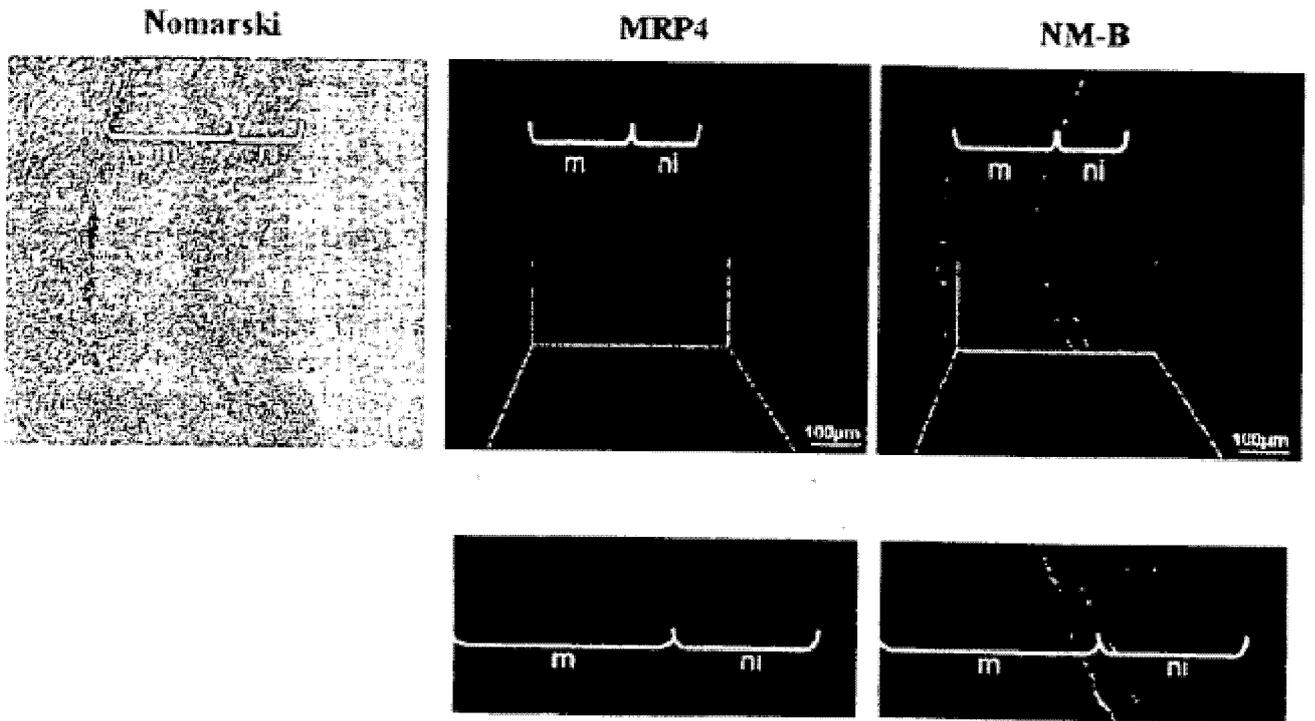


Figura 2 suplementaria

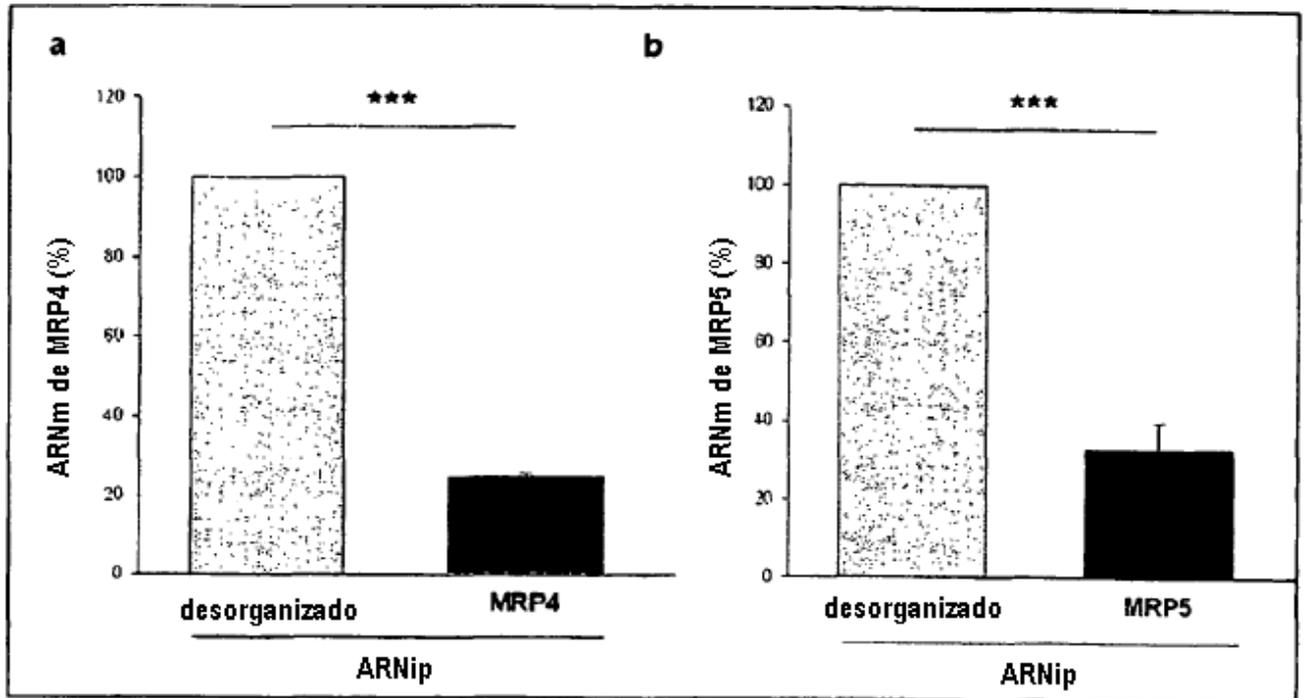


Figura 3 suplementaria

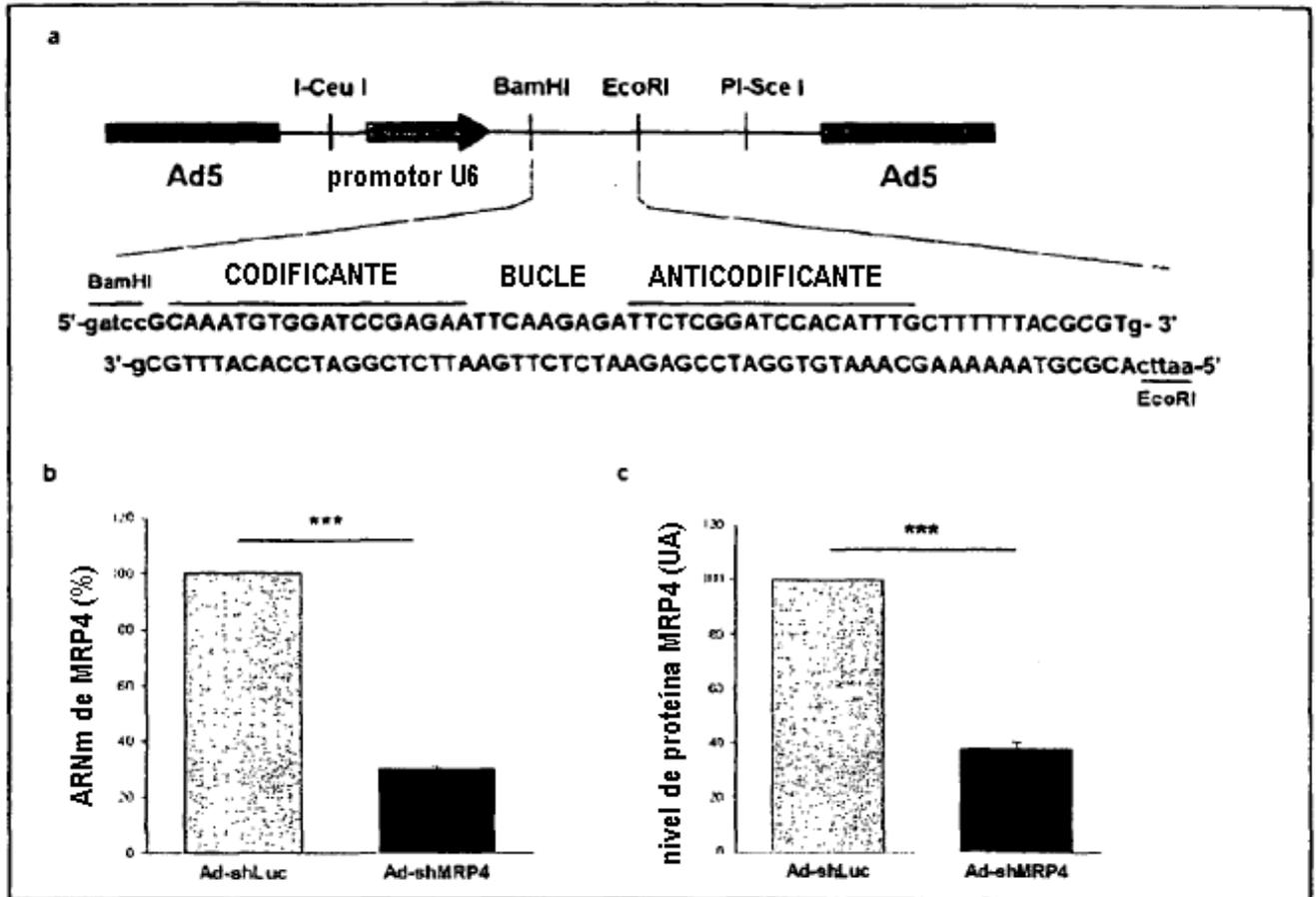


Figura 4 suplementaria

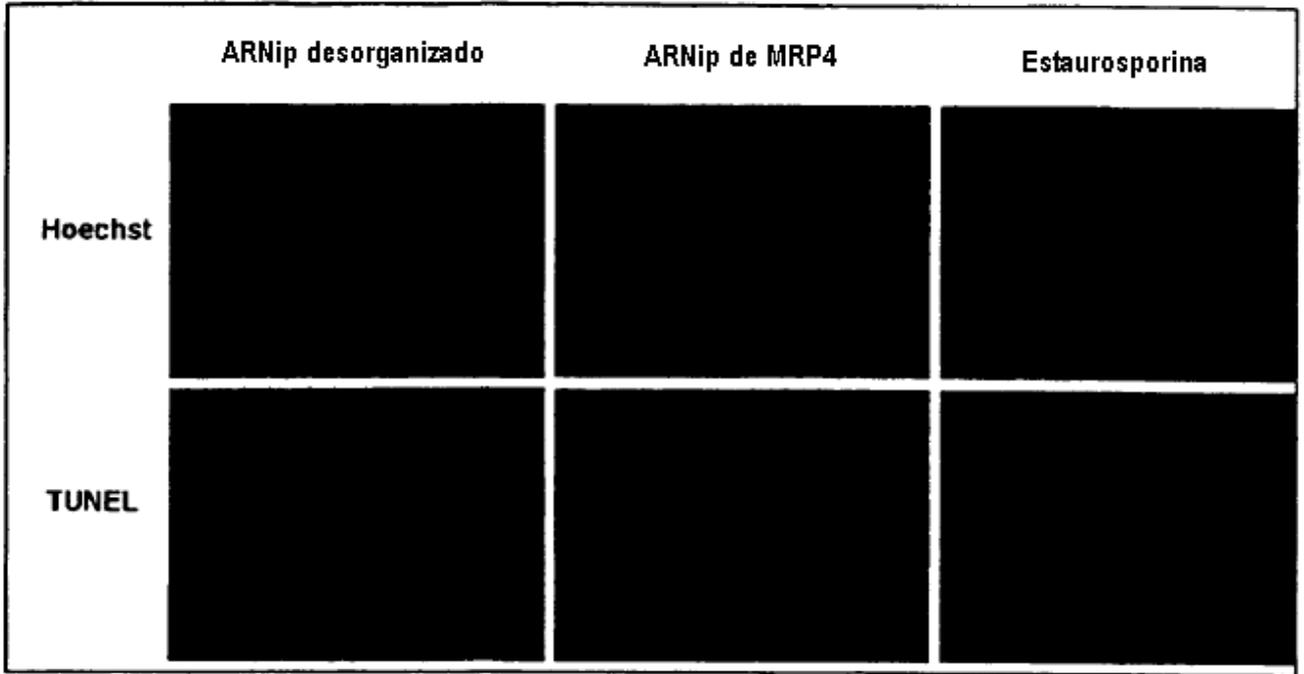


Figura 5 suplementaria