

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 287**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2008** **E 13179144 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017** **EP 2684955**

54 Título: **Procedimiento para la estimulación de la angiogénesis, la vascularización o la reparación vascular o para la inhibición de la angiogénesis tumoral**

30 Prioridad:

30.10.2007 DE 102007052114

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

25.01.2018

73 Titular/es:

**T2CURE GMBH (100.0%)
Kennedyallee 93
60596 Frankfurt, DE**

72 Inventor/es:

**DIMMELER, STEFANIE;
URBICH, CARMEN;
ZEIHER, ANDREAS y
BONAUER, ANGELIKA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Francisco

ES 2 651 287 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

Procedimiento para la estimulación de la angiogénesis, la vascularización o la reparación vascular o para la inhibición de la angiogénesis tumoral

5 La invención queda definida por las reivindicaciones que acompañan. Se divulga un procedimiento para la influencia de la expresión de miR-92 en una célula, en particular para la estimulación de la angiogénesis, vascularización o reparación vascular o para la inhibición o el bloqueo de la angiogénesis tumoral, así como el uso de un procedimiento de este tipo para la terapia de una enfermedad o de un estado. La divulgación se refiere además de ello, a una composición farmacéutica para la estimulación de la angiogénesis, vascularización o reparación vascular o para la inhibición o el bloqueo de la angiogénesis tumoral en una célula.

10 El endotelio tiene una importancia particular en el mantenimiento de la integridad y la funcionalidad de los vasos. El crecimiento de nuevos vasos se produce en el adulto mediante arteriogénesis, angiogénesis o vasculogénesis. Mientras que la arteriogénesis se define como el crecimiento de vasos colaterales, con angiogénesis se entiende el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos ya existentes. Durante la angiogénesis se activan células endoteliales inactivas mediante factores angiogénicos y comienzan a migrar, se perfilan y se organizan en estructuras tubulares (2). El término vasculogénesis describía originalmente la conformación de vasos sanguíneos nuevos en el embrión a partir de angioblastos, pero se refiere no obstante actualmente también, a la conformación de vasos sanguíneos a partir de células progenitoras endoteliales u otras células madre (1) adultas. La angiogénesis y la vasculogénesis representan procesos de desarrollo fisiológicos, los cuales tienen una importancia esencial en el restablecimiento del flujo sanguíneo en tejidos isquémicos y representan un paso básico en el crecimiento de tumores. La estimulación de la angiogénesis y la neovascularización fueron identificadas en pacientes afectados por isquemia, como posible estrategia terapéutica. En la angiogénesis tumoral, la inhibición de estos procesos conduce a la represión del crecimiento tumoral.

25 Los microARNs (miARNs) son pequeños ARNs no codificantes, que regulan (3) la expresión genética en el plano postranscripcional mediante degradación del ARNm diana o mediante represión traslacional. A diferencia de pequeños ARNs de interferencia (ARN de silenciamiento), que se unen a secuencias ARNm complementarias, la unión del miARN a un diana no se produce solo a un ARN complementario, sino que conforma estructuras ARN-ARN más complejas, las cuales se prefieren (4) termodinámicamente. Esta unión "incompleta" permite que una molécula miARN pueda unirse a diferentes moléculas ARNm. La regulación de un conjunto de genes (a diferencia de la monoterapia mediante un gen o un factor de crecimiento) puede representar una ventaja, cuando puede influirse debido a ello en procesos de regulación complejos. Hasta ahora se han identificado en el genoma humano más de 400 miARNs, pero la relevancia de la mayoría de estos miARNs para la función celular en procesos fisiológicos y patológicos continúa sin estar clara. Mientras que se ha descrito en el estado de la técnica, que la inactivación de las enzimas Dicer y Drosha con procesamiento de miARN influye en la angiogénesis (5 – 7), se han descrito solo pocos miARNs específicos, los cuales influyen en funciones celulares endoteliales y en la angiogénesis. miR-221 y miR-222 bloquean la migración celular endotelial, la proliferación y la angiogénesis *in vitro* mediante la interacción con el receptor de factor celular madre c-kit y regulación de la expresión eNOS de forma indirecta (6, 8). A diferencia de ello, la expresión de let7-f y miR-27b contribuye a la angiogénesis *in vitro* (7).

40 En el estado de la técnica se le ha atribuido al cluster miARN miR-17-92 una fuerte actividad de estimulación de la angiogénesis tumoral. El cluster miR-17-92 consiste en miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b y miR-92-1 (9). Este cluster miR-17-92 está activado en tumores inducidos por Myc y los miARNs individuales miR-18 y miR-19 pudieron identificarse como moléculas, las cuales interactúan específicamente con la expresión de proteínas antiangiogénicas. Una evaluación específica de las dianas de estos miARNs, mostró que miR-18 suprime preferiblemente la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), mientras que miR-19 interactúa (10) con el fuerte inhibidor de angiogénesis trombospondina-1 (TSP-1).

45 Según la invención se ha descubierto sorprendentemente, que miR-92 no estimula la angiogénesis tal como se describe en el estado de la técnica, sino que atenúa fuertemente la migración y la conformación de tubos de células endoteliales *in vitro* y la neovascularización *in vivo*. La inhibición de miR-92 aumenta la neovascularización. Como consecuencia de ello, miR-92 tiene una actividad antiangiogénica y no como se ha descrito hasta ahora en el estado de la técnica, una actividad proangiogénica.

50 Esta actividad antiangiogénica está relacionada con la inhibición de proteínas clave, las cuales controlan la angiogénesis y la actividad endotelial, incluyendo el óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la sirtuina 1 (SIRT1), los cuales son ambos esenciales (11 a 13) para las funciones endoteliales posnatales, e integrina $\alpha 5$, la cual controla (14) la motilidad celular endotelial y la interacción con la matriz. La inhibición de miR-92 mediante inhibidores miR-92 representa una nueva estrategia terapéutica para la mejora de la función celular endotelial y la neovascularización. Al mismo tiempo se ha descubierto que la sobreexpresión de miR-92 reduce la neovascularización.

Descripción de la invención

La invención se basa en que con miR-92 se desarrolla una actividad biológica antiangiogénica, y no como se ha descrito hasta ahora en el estado de la técnica, una actividad proangiogénica. La invención queda definida por las

reivindicaciones 1 y 6 independientes que acompañan. En las reivindicaciones secundarias se mencionan formas de realización especiales de la invención.

Se divulga a un procedimiento para la influencia de la expresión de miR-92 en una célula, en particular en el marco de la angiogénesis y/o de la vasculogénesis. Según la invención, el procedimiento presenta los siguientes pasos:

- 5 a) puesta a disposición de una célula; y
- b1) reducción de la expresión de miR-92 en la célula, para la estimulación de la angiogénesis, de la vascularización y/o de la reparación vascular, mediante la introducción de una molécula antisentido contra miR-92 en la célula, o
- 10 b2) aumento de la expresión de miR-92 en la célula, para la inhibición de la angiogénesis tumoral mediante la introducción de una construcción en la célula, presentando la construcción una secuencia miR-92 expresable. Es posible igualmente, introducir miR-92 en la célula.

En una forma de realización preferida, el procedimiento es un procedimiento *in vitro*.

15 El término reducir o aumentar la expresión de miR-92 en la célula, se basa en una comparación con la expresión de miR-92 en una célula tipo silvestre, como puede llevarse a cabo por ejemplo, mediante RT-PCR o PCR en tiempo real. La correspondiente modificación de la expresión puede determinarse también mediante los efectos funcionales de la fuerza de expresión modificada de miR-92 en las propiedades de la célula.

20 La molécula antisentido es una molécula monocatenaria, la cual presenta una secuencia complementaria esencialmente reversa a un ARN (en este caso miR-92) y que inhibe la función biológica de miR-92 mediante hibridización con miR-92. La molécula antisentido es preferiblemente un ARN inverso, el cual puede presentar opcionalmente modificaciones químicas.

La construcción puede ser un plásmido, un cósmido, un virus o un precursor miARN, presentando la construcción ventajosamente un medio para la transcripción de la secuencia miR-92 expresable contenida, como por ejemplo, un promotor, el cual está unido funcionalmente con la secuencia miR-92.

25 El término utilizado en este caso "miR-92" abarca tanto moléculas precursoras como pre-92a-1, pre-92a-2 y pre-92b, como también moléculas procesadas como miR-92a, y miR-92b (véanse también las secuencias según SEQ ID NO 1 a 5).

La introducción de una molécula o de una construcción puede producirse tanto mediante métodos físicos (como microinyección o electroporación), mediante métodos químicos (como con fosfato de calcio o lipofección), o mediante métodos virales (mediante virus).

30 De la influencia de la expresión de miR-92 en la célula resulta la influencia de la expresión de una proteína en la célula, la cual está elegida del grupo consistente en: eNOS, SIRT1, integrina alfa 5, integrina beta 1, integrina alfa v, Sprouty 2, TIMP 4, Tie 2, ANG 2, MKK 4, KLF 2, PCAF, EDG 1 y RAP 1B. Todas estas proteínas están asociadas con el control de la función celular endotelial, la protección arterial y/o la neovascularización posnatal. SIRT 1 está asociada además de ello, con enfermedades relacionadas con la edad.

35 La puesta a disposición de una célula comprende la puesta a disposición tanto de una célula de forma aislada, como por ejemplo, una célula con una línea celular clonal, como también la puesta a disposición de una célula, la cual es parte de un tejido, órgano o de un organismo.

40 La célula puesta a disposición puede comprender básicamente cualquier tipo de célula. La célula puesta a disposición es preferiblemente una célula vascular, una célula hematopoyética, una célula de músculo cardíaco, una célula inflamatoria y/o una célula neuronal. Esto incluye correspondientemente todas las células precursoras y madre de las células mencionadas. En una forma de realización preferida del procedimiento, la célula madre no es ninguna célula madre embrionaria humana. La célula puesta a disposición puede presentarse además de ello, tanto de forma individualizada, como también en unión con un tejido o un órgano. En una forma de realización, el procedimiento puede llevarse a cabo también *in vivo*.

45 La célula puesta a disposición es originaria preferiblemente de un metazoario, en particular de un mamífero (por ejemplo, un roedor como ratón o rata), un mono, un simio, una vaca, un cerdo, un perro o un gato o, de forma particularmente preferida, de un humano.

Reducción de la expresión de miR-92

50 Siempre y cuando el procedimiento conduce a una reducción de la expresión de miR-92 en la célula, frente a la expresión normal de miR-92 en una célula de tipo salvaje, se produce la reducción de la expresión mediante la puesta a disposición de una molécula, la cual está elegida del grupo consistente en moléculas antisentido, inhibidores miR-92 sintéticos e inhibidores de factor de transcripción. Esta reducción de la expresión de miR-92 tiene como consecuencia por ejemplo, un refuerzo de la vascularización y de la reparación vascular en el tejido.

En una forma de realización del procedimiento según la invención, la molécula antisentido es una molécula, la cual

5 hibrida con una molécula de ARN según una de las SEQ ID NO 1 a 5, tanto en el caso de condiciones estrictas como también menos estrictas. Esto incluye la posibilidad de que la molécula antisentido presente en el estado hibridado frente a miR-92, "incompatibilidades", las cuales no anulan sin embargo, la función como molécula antisentido. Se produce de esta manera, a pesar de emparejamiento(s) erróneos(s) de bases, la inhibición o la estructuración de miR-92. La molécula antisentido puede presentar en particular una longitud de hasta 80 nucleótidos, preferiblemente de hasta 30 nucleótidos, de manera particularmente preferida de 15 a 22 nucleótidos. En particular para la inhibición de los precursores miR-90 no maduros, la molécula antisentido puede presentar hasta 80 nucleótidos, en particular hasta 30 nucleótidos. La longitud mínima de una molécula antisentido de este tipo es preferiblemente de 12 nucleótidos, preferiblemente de 15 nucleótidos.

10 En una forma de realización preferida, la molécula antisentido presenta una secuencia, que es complementaria de forma reversa a una secuencia según una de las SEQ ID NO 1 a 5. Debido a ello no se da la conformación de emparejamiento(s) erróneo(s) de bases, lo cual tiene como consecuencia una inhibición eficiente de miR-92. En una configuración preferida de la invención, la molécula antisentido es una molécula con una secuencia según SEQ ID NO 6 u 8. Es posible que la molécula antisentido presente al menos una modificación química, por ejemplo, al menos un grupo de 2' O-metilo, de colesterol, de fosforotioato y/o de 2'-O-metoximetilo-2'-fluor. La molécula antisentido puede presentar también o adicionalmente componentes de ácido nucleico bloqueado (LNA, del inglés *locked nucleic acid*). Una forma de realización muy preferida de la molécula antisentido con una secuencia según SEQ ID NO 6 con modificaciones químicas es por ejemplo, la siguiente molécula:

20 C_tA_tGGCCGGGACAAGUGCA_tA_tU_tA_t-Chol (SEQ ID NO 9), representando las letras mayúsculas nucleótidos modificados de 2' O-metilo, la sub t ("t") un enlace de fosforotioato entre nucleótidos adyacentes, y "Chol" un grupo de colesterol.

Una forma de realización muy preferida de la molécula antisentido con una secuencia según SEQ ID NO 8 con modificaciones químicas es la siguiente molécula:

25 A_tC_tA_tGGCCGGGACAAGUGCA_tA_tU_tA_t-Chol (SEQ ID NO 10), representando las letras mayúsculas nucleótidos modificados de 2' O-metilo, la sub t ("t") un enlace de fosforotioato entre nucleótidos adyacentes, y "Chol" un grupo de colesterol.

Es preferida igualmente una molécula antisentido con una secuencia según SEQ ID NO 11, la cual presenta solo nucleótidos modificados de 2' O-metilo.

Los procedimientos para la síntesis de este tipo de moléculas antisentido son conocidos por el experto.

30 Un procedimiento del tipo mencionado anteriormente para la estimulación de la angiogénesis, la vascularización y la reparación vascular puede usarse para la terapia de una enfermedad o de un estado. La enfermedad o el estado (eventualmente patológico) se eligen del grupo consistente en isquemia (como infarto de miocardio, enfermedad cardiaca isquémica crónica, oclusión de arterias periféricas o del corazón, infarto isquémico, ictus), angiogénesis patológica (como angiogénesis tumoral, desarrollo de metástasis, retinopatía diabética, enfermedades inflamatorias crónicas), arteriosclerosis, secuelas patológicas o de la arteriosclerosis (síndrome coronario agudo, infarto de miocardio, ictus, cardiomiopatía) o envejecimiento (prematureo) o enfermedades relacionadas con la edad.

35 El procedimiento descrito puede usarse igualmente para el tratamiento de células madre o de células progenitoras (como células proangiogénicas, células progenitoras específicas de órganos, células derivadas de la médula o células precursoras circulantes).

40 De esta manera, el procedimiento puede usarse tanto *en vivo*, como también en *ex vivo* o *in vitro*, por ejemplo, para la producción de material de sustitución vascular, en particular para la terapia de sustitución de tejido, o en la investigación.

Aumento de la expresión de miR-92

45 Siempre y cuando en el procedimiento la expresión de miR-92 se aumente en una célula, por ejemplo, en una célula endotelial, frente a la expresión normal de miR-92 en una célula de tipo salvaje, esto puede producirse mediante el aumento de la expresión mediante la introducción en la célula de una construcción que presenta la secuencia miR-92 expresable. En una forma de realización preferida del procedimiento según la invención, la construcción miR-92 presenta una secuencia expresable según una de las SEQ ID NO 1 a 5 o puede expresar una secuencia de este tipo. Las configuraciones ventajosas de una construcción de este tipo se han descrito arriba. Alternativamente puede introducirse también miR-92 directamente en la célula.

50 Un procedimiento del tipo descrito en último lugar para la inhibición de la angiogénesis tumoral puede usarse para la terapia de una enfermedad o de un estado (patológico), el cual se elige del grupo consistente en desorden de angiogénesis, angiogénesis no deseada, tumores e inflamaciones crónicas.

Composición farmacéutica

55 La divulgación describe además, una composición farmacéutica, comprendiendo o bien un medio para la reducción

de la actividad o de la expresión de miR-92 en una célula en forma de una molécula antisentido contra miR-92, un inhibidor, eventualmente sintético, y/o un inhibidor de factor de transcripción; o un medio para el aumento de la expresión de miR-92 en una célula en forma de una construcción para la expresión de miR-92. En este caso, la construcción puede presentar o comprender una secuencia expresable según una de las SEQ ID NO 1 a 5. La molécula antisentido contra miR-92 comprendida en la composición farmacéutica presenta en una forma de realización una secuencia según SEQ ID NO 6, 8 u 11. Para otras configuraciones preferidas de la construcción o de la molécula antisentido, se remite a la descripción contenida arriba y aquí.

La divulgación se refiere además de ello, a un procedimiento para la producción de las composiciones farmacéuticas descritas arriba.

10 La composición farmacéutica puede presentarse en forma de pastillas, grageas, píldoras, granulados, aerosoles, soluciones en infusión, emulsiones, suspensiones, soluciones o, en o sobre el material de revestimiento de un dispositivo médico implantable, por ejemplo, de una endoprótesis.

El uso conforme a la invención del medio o de la composición farmacéutica puede producirse mediante formulaciones conocidas adecuadas.

15 El uso según la invención de los medios puede llevarse de manera conocida a las formulaciones habituales, como pastillas, grageas, píldoras, granulados, aerosoles, emulsiones, suspensiones y soluciones, mediante el uso de excipientes o diluyentes inertes, no tóxicos, adecuados farmacéuticamente. En este caso, la concentración de medio eficaz terapéuticamente, en relación con los compuestos eficaces terapéuticamente, ha de presentarse correspondientemente en una concentración de aproximadamente 0,1 % en peso a 95 % en peso, de forma preferida de aproximadamente 0,5 % en peso a 90 % en peso de la mezcla total, es decir, en cantidades, las cuales son suficientes para lograr las concentraciones de principio activo necesarias en el tejido diana.

Las formulaciones se producen por ejemplo, mediante estirado de los medios con diluyentes y/o excipientes, eventualmente mediante el uso de agentes emulgentes y/o de agentes de dispersión, pudiendo usarse por ejemplo, en el caso del uso de agua como medio de dilución, eventualmente diluyentes orgánicos como excipientes.

25 Como excipientes se mencionan por ejemplo, agua, diluyentes no tóxicos, como parafina (por ejemplo, fracciones de petróleo), aceites vegetales (por ejemplo, aceite de cacahuete, sésamo), alcoholes (por ejemplo, alcohol etílico, glicerina), excipientes, como harinas de roca (por ejemplo, caolinas, arcilla, talco, carbonato de calcio), harinas de roca sintéticas (por ejemplo, ácido silícico altamente disperso, silicatos), azúcar (por ejemplo, azúcar de caña, lactosa y glucosa), agentes emulgentes (por ejemplo, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno, éteres de alcoholes grasos de polioxietileno), agentes de dispersión (por ejemplo, lignina, lejías al sulfito, metilcelulosa, almidón y polivinilpirrolidona) y agentes lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, ácido esteárico y sulfato de sodio).

35 La aplicación se produce habitualmente de forma preferida oral o parenteralmente, en particular de forma perlingual o intravenosa. En el caso de la aplicación oral de los medicamentos según la invención, las pastillas pueden comprender naturalmente, además de los excipientes mencionados, también aditivos, como citrato de sodio, carbonato de calcio y fosfato de dicalcio junto con diferentes agentes aditivos, como almidón, preferiblemente fécula de patata, gelatina y similares. Pueden usarse además de ello también, para la conformación de pastillas, agentes lubricantes, como estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio y talco. En el caso de suspensiones acuosas, los principios activos pueden mezclarse además de con los excipientes mencionados más arriba, con diferentes agentes de mejora del sabor o colorantes. Para el caso del uso parenteral, pueden usarse soluciones de los principios activos mediante el uso de materiales excipientes líquidos adecuados.

Procedimiento para la terapia o profilaxis

45 La divulgación se refiere además de ello, a un procedimiento para la terapia o profilaxis de un individuo, en particular de un paciente, mediante el uso de miR-92 o de un antagonista miR-92 (por ejemplo, una molécula antisentido o un inhibidor de factor de transcripción) o de una composición farmacéutica según la descripción anterior o aquí comprendida. En el marco de un procedimiento de este tipo, pueden suministrarse cantidades de principio activo de entre 0,001 mg a 200 mg por kg de peso corporal por día.

Molécula antisentido contra miR-92

50 La invención se refiere también a una molécula antisentido para el uso según la reivindicación 6, contra miR-92 presentando una secuencia, la cual hibrida con una molécula de una secuencia según SEQ ID NO 1 a 5, presentando la molécula hasta 80 nucleótidos, en particular de 15 a 22 nucleótidos o consistiendo en ellos. Una molécula antisentido de este tipo presenta ventajosamente al menos 12 nucleótidos, preferiblemente al menos 15 nucleótidos. La hibridación puede producirse en condiciones estrictas o menos estrictas. El experto conoce procedimientos para la determinación de la hibridación.

55 Una molécula de este tipo puede presentar eventualmente modificaciones químicas. Es particularmente preferida una molécula según SEQ ID NO 6, 8 u 11, la cual presenta al menos una de las modificaciones químicas

mencionadas arriba. Las moléculas antisentido preferidas con modificaciones químicas son las moléculas según SEQ ID NO 9 y 10, las cuales se derivan de las moléculas según SEQ ID NO 6 u 8.

5 Una molécula de este tipo puede usarse para la estimulación de la angiogénesis, la vascularización y la reparación vascular. miR-92 o una molécula con una secuencia según una de las SEQ ID NO 1 a 5 puede usarse según la invención, para la inhibición de la angiogénesis tumoral y particularmente para la producción de una composición farmacéutica descrita anteriormente.

10 En particular, en una forma de realización preferida, la invención no se refiere a ningún procedimiento para clonar seres humanos o a procedimientos para la modificación de la identidad genética de la línea germinal del ser humano, así como tampoco al uso de embriones humanos para fines industriales o comerciales o a procedimientos para la modificación de la identidad genética de animales, los cuales son adecuados para producir sufrimiento de estos animales sin utilidad médica esencial para la persona o el animal, así como de los animales producidos con la ayuda de estos procedimientos.

La invención se explica con mayor detalle mediante ejemplos, sin limitarse a estos ejemplos. Los resultados de las pruebas descritas en los ejemplos se representan en las figuras.

15 Figuras

Muestran:

La figura 1: efectos de la sobreexpresión de miR-92 en funciones *in vitro* de células endoteliales (como células puestas a disposición).

20 (A) sobreexpresión de miR-92 en células endoteliales transfectadas con pre-miR-92.
(B/C) inhibición de conformación de brotes en un esferoide (B) y en un "ensayo Matrigel" (C).
(D/E/F) efecto de pre-miR-92 en la viabilidad (D) migración (E) y adhesión (F).

La figura 2: el efecto de la sobreexpresión de miR-92 en la angiogénesis *in vivo*.

25 (A) sobreexpresión de miR-92 en células endoteliales transfectadas con pre-miR-92.
(B/C/D) inhibición de la angiogénesis *in vivo*. Las HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, células endoteliales de la vena del cordón umbilical) se transfectaron con una muestra de control o con pre-miR-92 y se implantaron 1×10^6 células en "soportes Matrigel" *in vivo*. La angiogénesis se determinó en cortes H&E (B/C) y la perfusión se determinó (D) mediante la medición de la hemoglobina.

La figura 3: el efecto de la inhibición de miR-92 en la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*.

30 (A) estimulación de la gemación *in vitro* mediante oligonucleótidos de 2' O-metilo, que bloquean miR-92.
(B/C/D/E) el efecto de la fusión sistémica de un antagomir sobre la neovascularización *in vivo*. (B) diseño experimental, (C) expresión de miR-92 en diferentes órganos (corazón, aorta, bazo, hígado). (D) efectos en la perfusión según los resultados de medición de la concentración de hemoglobina, (E) imágenes representativas (tinción H&E) para la representación de conformación de vasos.

La figura 4: la identificación de moléculas diana de miR-92.

40 (A) perfil de expresión genética HUVEC tras tratamiento con pre-miR-92.
(B/C) confirmación de la falta de regulación de la expresión de proteína mediante Western blot en HUVEC tras transfección de pre-miR-92.
(D/E) detección del efecto de pre-miR-92 en la expresión de integrina mediante FACS.

La figura 5: influencia de miR-92a en la angiogénesis *in vitro* (a-c) e *in vivo* (d-f). *In vitro*: pre-miR-92 se sobreexpresó en HUVEC y la angiogénesis se determinó en el modelo esferoide (a) y ensayo Matrigel (b) *in vitro*. $N > 3$, $*p < 0.05$ versus muestra de control (Co). El panel C muestra ejemplos representativos. *In vivo*: se mezclaron con Matrigel HUVEC transfectadas con pre-miR-92a o microARN de control (Co) y se trasplantaron en ratones sin pelo. La conformación de vasos se determinó mediante la detección de las células integradas (d), la determinación del/de los vaso(s) (e) perfundidos en lectina *in vivo* y mediante la detección del contenido de hemoglobina (f). $N > 4$, $*p < 0.05$ versus muestra de control (Co).

50 La figura 6: influencia de inhibición de miR-92 en la angiogénesis *in vitro*.

a/b) miR-92a se bloqueó mediante sobre expresión de oligoribonucleótidos antisentido de 2' O-metilo y se determinó la angiogénesis en el modelo esferoide *in vitro*. $N > 3$, $*p < 0.05$ versus oligonucleótido de control (Co) (2'OMeGFP).

c) se inhibió miR-92a mediante la incubación con antagomir-92a y se determinó la angiogénesis en el modelo esferoide *in vitro*. N=5, *p<0.05 versus muestra de control PBS.

La figura 7: influencia de antagomir-92a en la conformación de vasos en el modelo Matrigel (a-c) y modelo de isquemia de extremidades posteriores (d-f).

5 Se inyectaron de forma intravenosa antagomir-92a, dos diferentes antagomirs de control o el diluyente PBS los días 1, 3, 5 (8 mg/kg de peso corporal) y se explañaron los soportes Matrigel el día 7. Se determinaron las cantidades de células inmigradas (H&E, a), de vasos positivos en lectina perfundidos (b) y el contenido de hemoglobina (c). N>4, p<0.05 versus PBS o muestras de control antagomir (Co). Antagomir-92a o muestras de control se inyectaron de forma intravenosa en los días 0, 2, 4, 7, 9 tras isquemia de extremidades posteriores y se determinó el riego sanguíneo mediante láser Doppler (d, ejemplo E). La ilustración F muestra la especificidad de antagomir-92a en la expresión de miR-92a y diversos otros microARNs. N>3, p<0.05 versus muestras de control (Co).

La figura 8: ilustración 4: influencia de antagomir-92a en la función cardiaca tras infarto de miocardio. El antagomir-92a, el antagomir de control (antagomir-Co) o el diluyente PBS se inyectaron de forma intravenosa (8 mg/kg de peso corporal) tras la inducción del infarto cardiaco los días 0, 2, 4, 7, 9, y se determinó la función cardiaca el día 14 mediante catéter Millar. a-c muestra la determinación de parámetros de función cardiaca (a: contractilidad, b: presión, c: constante de relajación). Los animales tratados con antagomir-92a muestran sin excepción mejores parámetros de funcionamiento cardiacos en comparación con el grupo antagomir-Co y PBS. D) muestra el aumento significativo de los capilares en diferentes regiones del corazón tras tratamiento con antagomir-92a. E) muestra la reducción de la magnitud de infarto y de la transformación fibrosa en el grupo tratado con antagomir-92a. Todos los experimentos N>5, *p<0.05 versus muestra de control (Co).

La figura 9: influencia de los componentes individuales del cluster miR-17-92 en la angiogénesis *in vitro*.

a) efecto directo de la sobreexpresión de los microARNs individuales en la angiogénesis en muestra esferoide (N>3, *p<0.05).

b) efecto paracrina de células tumorales, las cuales se transfectaron con miR-17 o miR-18, en la angiogénesis de células endoteliales. Como se representa, se transfectaron células tumorales y entonces el sobrenadante se pasó a células endoteliales (HUVEC), para comprobar el efecto de factores paracrinicos. La sobreexpresión de miR-17 conduce a un aumento de la angiogénesis.

Ejemplos

Material y métodos

Cultivo celular

35 Se obtuvieron células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC) de Cambrex y se cultivaron hasta la tercera pasada habiéndoseles añadido en medio basal (EBM; Cambrex), hidrocortisona, extracto de cerebro bovino, factor de crecimiento epidérmico y 10 % de suero de ternero fetal (FCS; Gibco). Tras la separación con tripsina se cultivaron las células en placas de cultivo de 6 cm durante al menos 24 a 48 horas.

Transfección

40 Para la inhibición de miR-92 se cultivaron HUVEC antes de la transfección con el inhibidor específico hasta una confluencia de 60 % a 70 %. Se sintetizaron oligoribonucleótidos 2'O-metilo antisentido contra miR-92 (5'-CAGGCCGGGACAAGUGCAAUA-3', SEQ ID NO 11) o GFP (5'-AAGGCAAGCUGACCCUGAAGUU-3', SEQ ID NO 7) de VBC Biotech y se transfectaron 50 nmol/l con GeneTrans II® (MoBiTec) según el protocolo del fabricante. Para la sobreexpresión de miR-92 se cultivaron HUVEC hasta una confluencia del 50 %. 10 nmol/l de pre-miR-92 o de pre-miR de control (Ambion) se transfectaron con Lipofectamin RNAiMAX (Invitrogen) según el protocolo del fabricante.

Estrategia antagomir

El ARN monocatenario utilizado en este caso consistió en 21 a 23 nucleótidos y fue sintetizado por VBC Biotech como se ha descrito (13). Todos los modelos animales se mantuvieron en un fondo C57BL/6J. Se inyectaron a ratones de ocho semanas de edad subcutáneamente a lo largo de la línea central abdominal dos "soportes Matrigel Basement Matrix" el día 0 y obtuvieron inyecciones de vena de cola de una solución salina o de un antagomir 92 los días 1, 3 y 5. Antagomir 92 se suministró en dosis de 8 mg por kg de peso corporal en 0,2 ml de solución tampón de fosfato salino (PBS) por inyección. El sexto día se recogieron tejido y los "soportes Matrigel". El tejido se congeló en nitrógeno líquido y se guardó para el análisis de ARN a -80 °C. Para el análisis de la hemoglobina se retiró un "soporte Matrigel" tras siete días y se homogeneizó en 130 µl de agua desionizada. Tras la centrifugación se usó el sobrenadante en una muestra Drabkin (Sigma-Aldrich) para la medición de la concentración de la hemoglobina. Se

usaron concentraciones madre de la hemoglobina para la producción de una curva estándar. Los resultados se expresan en relación con la proteína total en el sobrenadante. El segundo “soporte Matrigel” se usó para la cuantificación de células entrantes mediante tinción H&E.

Análisis Western Blot

- 5 Para el análisis Western Blot se lisaron HUVEC en tampón de lisado RIPA (Sigma) durante 20 minutos en hielo. Tras un centrifugado de minutos a 20.000 x g (4 °C) se determinó el contenido de proteínas de las muestras mediante el método Bradford. Se cargaron cantidades de proteína iguales en un gel de poliacrilamida SDS y se transfirieron a una membrana PVDF o de nitrocelulosa. Los Western Blots se llevaron a cabo mediante el uso de anticuerpos con integrina $\alpha 5$ (anticuerpos policlonales antiintegrina $\alpha 5$ de conejo; 1:250, Chemikon), MKK4 (anti MKK4 policlonal de conejo, 1:1.000, Cell Signaling), eNOS (anti-eNOS monoclonal de ratón, 1:2.500, BD), SIRT 1 (anti-SIRT1 policlonal de conejo, 1:1.000, Upstate) o tubulina (anti-tubulina monoclonal de ratón; 1:1.500, Dianova).

RT-PCR

- 15 Para determinar la expresión miARN diferencial en HUVEC, las cuales se transfectaron con oligoribonucleótidos antisentido de 2' O-metilo contra miR-92 o pre-miR-92, 24 horas tras la transfección, se aisló la totalidad de ARN mediante el uso de TRIzol (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Se llevó a cabo una RT-PCR mediante el uso del kit de detección mirVana™ qRT-PCR miARN (Ambion) y sets primarios, los cuales son específicos para la amplificación de hsa-miR-92 (Ambion) (un ciclo: 3 minutos a 95 °C, 25 ciclos: 15 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C).

Ensayo de migración

- 20 Para determinar la migración de células endoteliales, se separaron con tripsina HUVEC, se cultivaron mediante centrifugación y se resuspendieron en 500 μ l de EBM con 0,1 de BSA, se contaron y se dispusieron en la cámara superior de una cámara de Boyden modificada (5×10^4 células por cámara, tamaños de poro 8 μ m, BD Biosciences), la cual estaba revestida con 2,5 μ g/l de fibronectina. La cámara se dispuso en una placa de cultivo con 24 pocillos, los cuales contenían EBM con 0,1 % de BSA y factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF, 50 ng/ml).
- 25 Tras una incubación durante 5 horas a 37 °C, se retiraron mecánicamente las células no migrantes del lado superior de la cámara y las células restantes en el lado inferior se fijaron con 4 % de formaldehído. Para la cuantificación se tiñeron los núcleos celulares con 4'6-diaminofenilindol (DABI). Las células migrantes en el lado inferior de la cámara se contaron manualmente en cinco campos microscópicos elegidos arbitrariamente.

Ensayo de formación de vasos

- 30 Las HUVEC (7×10^4) se cultivaron en una placa con 12 pocillos (Grenier) revestidos de 200 μ l de “Matrigel Basement membrane Matrix” (DB Biosciences). Las reticulaciones endoteliales conformadas se cuantificaron tras 24 horas en cinco campos microscópicos elegidos arbitrariamente, mediante un microscopio controlado por ordenador, mediante el uso del programa KS300 3.0 (Zeiss).

Ensayo de angiogénesis basado en esferoide

- 35 Los esferoides celulares endoteliales de cantidad celular definida se produjeron tal como se ha descrito (22, 23). La angiogénesis *in vitro* se determinó mediante medición de la longitud acumulativa de las estructuras resultantes, que crecieron de cada esferoide, y en concreto mediante el uso de un software de imagen digital (Axioplan, Zeiss), fueron analizados 10 esferoides por grupo experimental y experimento.

Ensayo de viabilidad MTT

- 40 La medición de la viabilidad celular se produjo mediante el uso del (bromuro de 3-(3,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio) (ensayo MTT). 48 horas tras la transfección se introdujeron 0,5 mg/ml de MTT en cada pocillo y las células se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Las células se lavaron con PBS y se lisaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con tampón de lisado (40 nmol/l HCl en isopropanol). La absorción se midió fotométricamente a 550 nm.

Adhesión de matriz celular

- 45 Se revistieron placas de cultivo celular con 96 pocillos durante la noche a 4 °C de 1 μ g/ml de colágeno I humano recombinante soluble (Roche, Mannheim, Alemania) o de 2,5 μ g/ml de fibronectina humana (Roche, Mannheim, Alemania) en PBS y se incubaron entonces durante una hora a temperatura ambiente con 3 % (peso/porcentaje en volumen) de albúmina sérica humana (HSA) inactiva por calor (2 horas, 56 °C). Las HUVEC se tiñeron con 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(y 6)-éster acetoximetílico de carboxifluoresceína (BCECF-AM) o Cell Tracker Green (Molecular Probes, Eugene, Oregon) y después de la separación se resuspendieron con tripsina en EBM con 0,05 % de HSA. Entonces se seleccionaron 50.000 células por pocillo en 100 μ l de EBM con 0,05 % de HSA en los pocillos revestidos y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C. Tras el lavado de células no adherentes con EBM caliente, las células adherentes se cuantificaron triplemente con un dispositivo de lectura de placa de fluorescencia (Fluostat,

BMG Lab Technologies, Offeburg, Alemania).

Análisis de citometría de flujo

5 Para la permeabilización se separaron con tripsina HUVEC transfectadas con pre-miR-92 o muestra de control, se fijaron en 4 % de formaldehído durante 10 minutos y se trataron con 0,1 % de TritonX-100. Las células (permeabilizadas y no permeabilizadas) se bloquearon mediante el uso de 1 % de BSA y se tiñeron con anticuerpos de integrina $\alpha 5$ (Anti-CD49e-FITC 1:10, Immunotech) o integrina $\beta 1$ (Anti-CD29-APC 1:20, BD). Las células se analizaron con un dispositivo FACS Canto II (BD).

Ensayo “soporte Matrigel” *in vivo*

Este ensayo se llevó a cabo como se ha descrito (24), no obstante, con las siguientes modificaciones:

10 Se transfectaron HUVEC con pre-miR-92 o para el control, como se ha descrito arriba. 18 horas tras la transfección se marcaron las células con “cell Tracker CM-Dil” (Invitrogen), se separaron, se lavaron y se contaron. 1×10^6 células se resuspendieron en 30 μ l de PBS y se mezclaron con 500 μ l de “Matrigel Basement Membrane Matrix” (DB Biosciences) comprendiendo 15 unidades de heparina (Sigma-Aldrich). La mezcla de células-Matrigel se inyectó subcutáneamente en ratones sin pelo (Harlan) atímicos hembra de seis a ocho
15 semanas de edad, a lo largo de la línea central abdominal. El análisis de la hemoglobina y la tinción H&E se llevaron a cabo como se ha descrito arriba.

Perfilado de ARNm Affymetrix

Se transfectaron HUVECS con pre-miR-92 o para el control. La totalidad del ARN se aisló tras 48 horas y se midió el perfil de expresión genética mediante un ensayo de expresión de chip de gen Affymetrix.

20 Resultados

Pre-miR-92 bloquea funciones celulares endoteliales *in vitro* e *in vivo*

Para examinar el efecto de miR-92 en células endoteliales, se transfectaron HUVEC con el precursor miR-92 pre-miR-92 y se determinó el efecto de esta transfección en diferentes ensayos *in vitro*. La sobreexpresión eficiente de miR-92 se comprobó en primer lugar mediante RT-PCR (figura 1A). La sobreexpresión miR-92 bloqueó de manera
25 significativa la formación de estructuras de vaso en un ensayo esferoide (figura 1B) e inhibió la formación de una reticulación vascular en Matrigeles (figura 1C), circunstancia que pone de manifiesto que miR-92 es un regulador negativo de la angiogénesis *in vitro*. Para determinar un posible efecto tóxico de miR-92, se midió la viabilidad celular. En este caso no pudieron determinarse tras la transfección de pre-miR-92 en comparación con células no transfectadas, diferencias significativas (figura 1D). Dado que la migración celular endotelial para la actividad de angiogénesis de células *in vitro* es de gran importancia, se determinó adicionalmente la migración de HUVEC en
30 condiciones basales y como respuesta a VEGF. Pre-miR-92 redujo la migración (figura 1E) y la adhesión de las células a fibronectina (figura 1F). Debido a ello, pre-miR-92 no muestra ningún efecto tóxico directo, sino que bloquea la respuesta celular endotelial, que se requiere para la angiogénesis. Se determinó además de ello, el efecto de pre-miR-92 en la angiogénesis *in vivo*. Para ello se implantaron HUVEC transfectadas con pre-miR-92 en un “soporte Matrigel” en ratones sin pelo *in vivo*. La eficiencia de la inhibición se controló respectivamente en una
35 subfracción de las células implantadas (figuras 2A). Como se muestra en las imágenes representativas de la figura 2B y la cuantificación de la figura 2C, pre-miR-92 bloquea el crecimiento de los vasos *in vivo* de forma eficiente. Además de ello, la perfusión está significativamente reducida, lo cual pudo demostrarse mediante medición de la concentración de hemoglobina en los “soportes Matrigel” explantados (figura 2B).

40 La inhibición de miR-92 aumenta la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*

Se examinó además de ello, si la inhibición de miR-92 tenía como consecuencia la estimulación del crecimiento de vasos. miR-92 fue inhibido mediante oligoribonucleótidos antisentido de 2' O-metilo (O-metilo-miR-92) y la formación de estructuras de vasos *in vitro* se determinó mediante un ensayo esferoide. O-metilo-miR-92 aumentó la formación de brotes *in vitro* (figura 3A), circunstancia que pone de manifiesto que la inhibición de miR-92 podría representar
45 una nueva estrategia terapéutica para la mejora de la angiogénesis. Para comprobar esta hipótesis, se inhibió sistémicamente miR-92 mediante el uso de llamados “antagomirs”, oligonucleótidos de ARN monocatenarios, que presentan una secuencia complementaria frente a miARNs específicos. Modificaciones químicas conducen a una estabilidad aumentada y conjugación de colesterol para una absorción mejorada en las células (15). Antagomirs orientados contra miR-92 se suministraron como se representa en la figura 3B en tres días. La entrega sistémica de antagomirs mejoró el crecimiento de vasos y la perfusión del “soporte Matrigel” *in vivo* (figuras 3C/D). Como
50 resultado, la inhibición de miR-92 aumenta funciones celulares endoteliales *in vitro* y mejora el crecimiento de vasos *in vivo*.

Identificación de genes diana de miR-92

Los miARNs controlan genes diana mediante degradación del ARNm diana o mediante represiones translacionales.

Para poder determinar los ARNms diana, los cuales se degradan como respuesta a la sobreexpresión de miR-92, se llevó a cabo un análisis de chip con una matriz de expresión de gen ARNm Affymetrix con 54.681 genes (HG-U133 Plus 2). El análisis de los ARNms regulados identificó diferentes enzimas clave, las cuales controlan la función endotelial, incluyendo eNOS, SIRT1, integrinas y factores de crecimiento como angiopoyetina 2 (figura 4A). Una parte de los genes inactivados son compatibles con un análisis llevado a cabo *in silico* de potenciales dianas de miR-92 (tabla 1). Para confirmar los resultados de la filtración, se detectó la expresión de proteína de los correspondientes genes mediante Western Blot o análisis FACS. En consonancia con los resultados pronosticados, se reprimió de forma significativa la expresión de proteína de eNOS, SIRT1 e integrina $\alpha 5$ mediante pre-miR-92 (figuras 4B a E).

10 **Tabla 1:** pronóstico *in silico* de moléculas diana de miR-92, a través de las cuales se transmite el efecto biológico de miR-92

miR-92 – dianas

- Integrina $\alpha 5$
- Integrina αv
- 15 SIRT 1
- MKK4
- KLF 2
- PCAF
- EDG 1
- 20 RAP 1B

Como resultado, miR-92 muestra un fuerte efecto antiangiogénico e influye en funciones celulares endoteliales *in vitro* e *in vivo*. En consonancia con ello, el bloqueo de miR-92 mediante infusión sistémica de un antagomir, conduce a un crecimiento de vasos mejorado *in vivo*. Este resultado es sorprendente, dado que se encuentra (10) en oposición a la actividad proangiogénica descrita del miR-17-92 del cluster.

25 Los presentes datos muestran que miR-92 influye en la expresión de diferentes proteínas, las cuales se conocen por tener una importancia decisiva en la biología celular endotelial. Entre los genes identificados mediante una micromatriz, pudo confirmarse en particular la inactivación de eNOS, SIRT1 e integrina $\alpha 5$ a nivel de las proteínas. Los ratones, los cuales son deficientes para estas proteínas, muestran una función vascular perjudicada y/o una capacidad perjudicada para la neovascularización postnatal.

30 eNos tiene una importancia en el mantenimiento de la reactividad vascular y bloquea apoptosis de células endoteliales (16). La histona deacetilasa SIRT1 estimula la longevidad en organismos modelo y controla la neovascularización y la maduración vascular en mamíferos (13, 17). La falta de regulación de integrinas puede tener un efecto negativo en la interacción con la matriz celular y puede perjudicar de esta manera la señalización antiapoptótica y la migración celular (14, 18). El factor de crecimiento angiopoyetina 2, su receptor Tie2 y los inhibidores de proteasa como TIMP4 controlan la maduración vascular (19, 20). Como consecuencia de ello, miR-92 interactúa con una serie de genes, los cuales controlan en diferentes niveles funciones celulares endoteliales. La capacidad de miR-92 de influir en diferentes efectores, representa una ventaja de la estrategia terapéutica basada en miARN y contribuye a superar la capacidad terapéutica limitada de una terapia basada en un único factor de crecimiento o en un único gen, de una enfermedad isquémica, dado que los procesos complejos del crecimiento vascular, de la maduración vascular y del mantenimiento funcional de los vasos, presuponen de forma conocida una regulación finamente adaptada de una serie de genes.

45 Como resultado, la influencia de miR-92 representa una estrategia terapéutica nueva para el control de funciones celulares endoteliales. En particular, el uso sistémico aquí mostrado de antagomirs es adecuado para la influencia de las funciones miARN. La inhibición de miR-92 mediante antagomirs aumenta el crecimiento vascular y contribuye a la mejora de la neovascularización y de la reparación vascular. En relación con los genes, los cuales se conocen por su efecto arterioprotector, como por ejemplo, eNOS, el bloqueo de miR-92 es provechoso en la terapia antiarteriosclerótica. Dado que a SIRT 1 se le atribuye (25) también una función neuroprotectora en enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo, Parkinson), los antagomirs miR-92 pueden usarse exitosamente también en este cuadro clínico. A diferencia de ello, la sobreexpresión de miR-92 es útil por ejemplo, para el bloqueo de la angiogénesis tumoral, dado que mediante ella, se reduce fuertemente el crecimiento vascular.

50 La presente invención comprende en particular las siguientes formas de realización:

Forma de realización 1: procedimiento para la influencia de la expresión de miR-92 en una célula, presentando los siguientes pasos:

- puesta a disposición de una célula; y
- 55 - reducción de la expresión de miR-92 en la célula, para la estimulación de la vascularización o de la reparación vascular, mediante la introducción de una molécula antisentido contra miR-92 en la célula, o
- aumento de la expresión de miR-92 en la célula, para la inhibición de la angiogénesis tumoral mediante la introducción de una construcción en la célula, presentando la construcción una secuencia de miR-92 expresable.

Forma de realización 2: procedimiento según la forma de realización 1, procediendo la célula puesta a disposición de un metazoo, en particular de un mamífero.

5 Forma de realización 3: procedimiento según la forma de realización 1 o 2, siendo la célula puesta a disposición una célula vascular, una célula hematopoyética, una célula de músculo cardíaco, una célula inflamatoria, una célula neuronal, una célula progenitora o una célula madre, no siendo la célula madre ninguna célula madre embrionaria humana.

Forma de realización 4: procedimiento según la forma de realización 1 a 3, siendo la molécula antisentido una molécula que hibrida con una molécula de ARN según una de las SEQ ID NO 1 a 5, en particular una molécula con una secuencia según SEQ ID NO 6, 8 u 11.

10 Forma de realización 5: procedimiento según la forma de realización 1 a 4, presentando la molécula antisentido una secuencia, la cual es complementaria a la secuencia según una de las SEQ ID NO 1 a 5.

Forma de realización 6: procedimiento según la forma de realización 1 a 5, presentando la molécula antisentido una longitud de hasta 30 nucleótidos, en particular de 15 a 22 nucleótidos.

15 Forma de realización 7: procedimiento según la forma de realización 1 a 6, presentando la secuencia miR-92 expresable una secuencia según SEQ ID NO 1 a 5.

Forma de realización 8: uso de un procedimiento según la forma de realización 1 a 6 para la terapia de una enfermedad o de un estado, elegido del grupo consistente en isquemia, angiogénesis patológica, arteriosclerosis, secuelas patológicas de la arteriosclerosis y enfermedades asociadas a la edad, reduciéndose la expresión de miR-92 celular mediante la introducción de una molécula antisentido contra miR-92 en la célula.

20 Forma de realización 9: uso de un procedimiento según la forma de realización 1 a 3 o 7, para la terapia de una enfermedad o de un estado, eligiéndose la enfermedad o el estado del grupo consistente en desorden de angiogénesis, angiogénesis no deseada, tumores e inflamaciones crónicas, aumentándose de la expresión de miR-92 en la célula mediante la introducción de una construcción en la célula, presentando la construcción una secuencia miR-92 expresable.

25 Forma de realización 10: uso de un procedimiento según la forma de realización 1 a 6 para la preparación de material de sustitución vascular.

Forma de realización 11: composición farmacéutica presentando

30 - un medio para la reducción de la actividad o de la expresión de miR-92 en una célula en forma de una molécula antisentido contra miR-92, o
- un medio para el aumento de la expresión de miR-92 en una célula en forma de una construcción para la expresión de miR-92.

Forma de realización 12: composición farmacéutica según la forma de realización 11, presentando la construcción una secuencia expresable según una de las SEQ ID NO 1 a 5.

35 Forma de realización 13: composición farmacéutica según la forma de realización 11, presentando la molécula antisentido contra miR-92 una secuencia según SEQ ID NO 6, 8 u 11.

Forma de realización 14: molécula antisentido presentado una secuencia, la cual hibrida con una molécula con una secuencia según SEQ ID NO 1 a 5, presentando la molécula antisentido hasta 30 nucleótidos, en particular entre 15 y 22 nucleótidos, en particular una molécula antisentido con una secuencia según SEQ ID NO 6, 8 u 11.

40 Forma de realización 15: uso de una molécula según la forma de realización 14 para la reducción de la actividad de miR-92 o expresión de miR-92 en una célula.

Forma de realización 16: uso de miR-92 para la estimulación de la vascularización y de la reparación vascular o para la inhibición de la angiogénesis tumoral.

45 Forma de realización 17: uso de miR-92, en particular para la preparación de una composición farmacéutica, para el tratamiento de isquemia, angiogénesis patológica, arteriosclerosis, secuelas patológicas de la arteriosclerosis y enfermedades asociadas a la edad.

Referencias

- 1 Carmeliet, P. (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6 (4), 389-395.
 2 Adams, R.H. and Alitalo, K. (2007) Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (6), 464-478
 3 Bartel, D.P. (2004) MicroARNs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116 (2), 281-297
 4 Hofacker, I.L. (2007) How microARNs choose their targets. *Nat Genet* 39 (10), 1191-1192

5 Yang, W.J. et al. (2005) Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem* 280 (10), 9330-9335

6 Suarez, Y. et al. (2007) Dicer dependent microARNs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res* 100 (8), 1164-1173

5 7 Kuehbachner, A. et al. (2007) Role of Dicer and Drosha for endothelial microARN expression and angiogenesis. *Circ Res* 101 (1), 59-68

8 Polisen, L. et al. (2006) MicroARNs modulate the angiogenic properties of HU-VECs. *Blood* 108 (9), 3068-3071

9 Venturini, L. et al. (2007) Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. *Blood* 109 (10), 4399-4405

10 10 Dews, M. et al. (2006) Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microARN cluster. *Nat Genet* 38 (9), 1060-1065

11 Murohara, T. et al. (1998) Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 101 (11), 2567-2578

15 12 Aicher, A. et al. (2003) Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 9 (11), 1370-1376

13 Potente, M. et al. (2007) SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev* 21 (20), 2644-2658

20 14 Kim, S. et al. (2000) Regulation of integrin alpha vbeta 3-mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin alpha5beta1 and protein kinase A. *J Biol Chem* 275 (43), 33920-33928.

15 Krutzfeldt, J. et al. (2005) Silencing of microARNs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438 (7068), 685-689

16 Dimmeler, S. and Zeiher, A.M. (1999) Nitric oxide - an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ* 6, 964-968

25 17 Imai, S. et al. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NADdependent histone deacetylase. *Nature* 403 (6771), 795-800.

18 Zhang, Z. et al. (1995) The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (13), 6161-6165

19 Asahara, T. et al. (1998) Tie2 receptor ligands, Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* 83, 233-240

30 20 Sang, Q.X. (1998) Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res* 8 (3), 171-177

21 Care, A. et al. (2007) MicroARN-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 13 (5), 613-618

22 Korff, T. and Augustin, H.G. (1998) Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol* 143 (5), 1341-1352

35 23 Diehl, F. et al. (2007) The histone methyltransferase MLL is an upstream regulator of endothelial cell sprout formation. *Blood* 109 (4), 1472-1478

24 Potente, M. et al. (2005) Involvement of FoxO transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 115(9), 2382-2392.

25 Dillin, A. and Kelly, J.W. (2007) The yin-yang of sirtuins. *Science* 317 (5837), 461-462

LISTADO DE SECUENCIAS

40	<110> t2cure GmbH	
	<120> Procedimiento para la estimulación de la angiogénesis, vascularización o reparación vascular o para la inhibición de la angiogénesis tumoral	
45	<130> FB22960/A	
	<150> DE 10 2007 052 114.8	
	<151> 30-10-2007	
50	<160> 11	
	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
55	<211> 78	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 1	
	cuuucucacac agguugggau cgguugcaau gcuguguuuc uguaugguau ugcacuuguc	60
	ccggccuguu gaguuugg	78

ES 2 651 287 T3

<210> 2
 <211> 75
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 2

ucauucccugg guggggauuu guugcauuac uuguguucua uauaaaguau ugcacuuguc 60
ccggccugug gaaga 75
 10
 <210> 3
 <211> 96
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 3

cgggccccgg gcgggcgga gggacgggac gcgugcagu guuguuuuuu cccccgcaa 60
uauugcacuc gucccggccu ccggcccccc cggccc 96
 20
 <210> 4
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 4
 uauugcacuu gucccggccu gu 22
 30
 <210> 5
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 5
 uauugcacuc gucccggccu cc 22
 35
 <210> 6
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> artificial
 40
 <220>
 <223> Oligoribonucleótido antisentido contra miR-92
 <400> 6
 caggccggga caagugcaau a 21
 45
 <210> 7
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> artificial
 50
 <220>
 <223> Oligoribonucleótido antisentido 2'O-metilo contra GFP
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(22)
 <223> Nucleótido modificado con 2'O-metilo
 <400> 7

ES 2 651 287 T3

aaggcaagcu gaccugaag uu 22

5 <210> 8
<211> 22
<212> ARN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Oligoribonucleótido antisentido contra miR-92

acaggccggg acaagugcaa ua 22

15 <210> 9
<211> 21
<212> ARN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Oligoribonucleótido antisentido modificado con 2\2220-metilo contra miR-92

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> Enlace fosfotioato

30 <220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> Enlace fosfotioato

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(19)
<223> Enlace fosfotioato

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(20)
<223> Enlace fosfotioato

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> Enlace fosfotioato

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> grupo colesteró 3'

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> fosfotioato

caggccggga caagugcaau a 21

60 <210> 10
<211> 22
<212> ARN
<213> Artificial

65 <220>
<223> Oligoribonucleótido antisentido modificado con 2\2220-metilo contra miR-92

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Enlace fosfotioato
 5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> Enlace fosfotioato
 10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> Enlace fosfotioato
 15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (19)..(20)
 <223> Enlace fosfotioato
 20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> Enlace fosfotioato
 25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(22)
 <223> Enlace fosfotioato
 30

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> grupo colester 3'
 35

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(22)
 <223> fosfotioato
 40

<400> 10
 acaggccggg acaagugcaa ua 22

<210> 11
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 45

<220>
 <223> Oligoribonucleótido antisentido modificado con 2'2220-metilo contra miR-92
 50

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> Nucleótido modificado con 2'O-metilo
 55

<400> 11
 caggccggga caagugcaau a 21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una molécula antisentido para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o para la prevención del síndrome coronario agudo, infarto de miocardio, ictus, cardiomiopatía, enfermedad cardíaca isquémica crónica, oclusión de arterias periféricas o infarto isquémico, siendo la molécula antisentido complementaria a miR-92.
2. El uso según la reivindicación 1, presentando la molécula antisentido una longitud de hasta 30 nucleótidos, en particular de 15 a 22 nucleótidos.
- 10 3. El uso según una de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo la molécula antisentido al menos una modificación química, siendo la al menos una modificación química un grupo 2'-O-metilo, un grupo colesterol, un grupo fosforotioato, un grupo 2'-O-metoxietilo, un grupo 2'-fluoro, o un componente de ácido nucleico bloqueado (LNA, del inglés *locked nucleic acid*).
4. El uso según una de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo la molécula antisentido una secuencia, la cual es complementaria a una molécula de las secuencias de las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4 o 5.
- 15 5. Uso según una de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo la molécula antisentido una secuencia según SEQ ID NO 6, 8 u 11.
6. Molécula antisentido para el uso en el tratamiento o la prevención del síndrome coronario agudo, infarto de miocardio, ictus, cardiomiopatía, enfermedad cardíaca isquémica crónica, oclusión de arterias periféricas o infarto isquémico, siendo la molécula antisentido complementaria a miR-92.
- 20 7. La molécula antisentido para el uso según la reivindicación 6, presentando la molécula antisentido una longitud de hasta 30 nucleótidos, en particular de 15 a 22 nucleótidos.
8. La molécula antisentido para el uso según las reivindicaciones 6 o 7, comprendiendo la molécula antisentido al menos una modificación química, siendo la al menos una modificación química un grupo 2'-O-metilo, un grupo colesterol, un grupo fosforotioato, un grupo 2'-O-metoxietilo, un grupo 2'-fluoro, o un componente de ácido nucleico bloqueado (LNA, del inglés *locked nucleic acid*).
- 25 9. La molécula antisentido para el uso según las reivindicaciones 6 a 8, comprendiendo la molécula antisentido una secuencia, la cual es complementaria a una molécula de una secuencia de las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4 o 5.
10. La molécula antisentido para el uso según una de las reivindicaciones 6 a 9, comprendiendo la molécula antisentido una secuencia según las SEQ ID NO 6, 8 u 11.

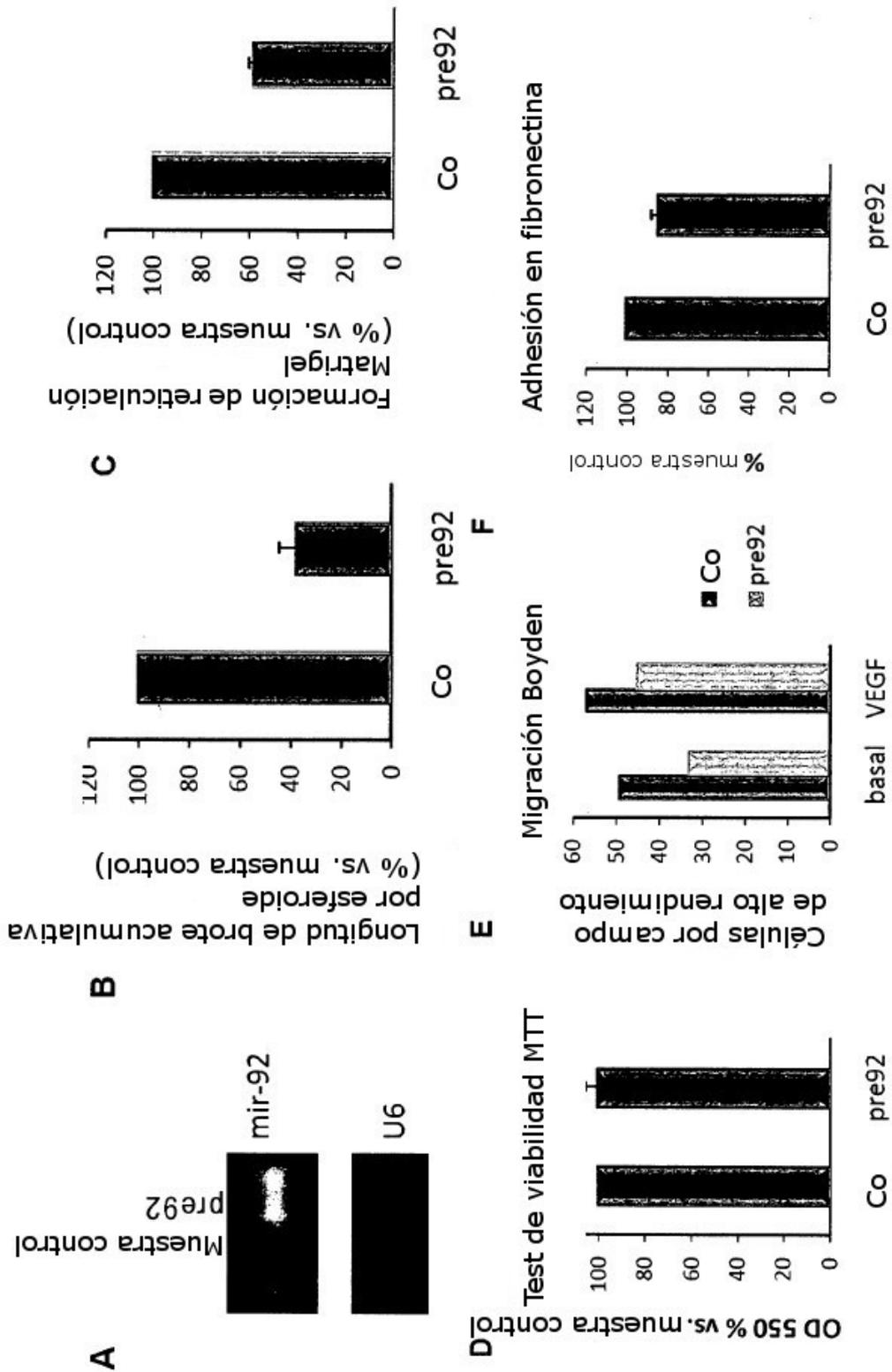


Figura 1

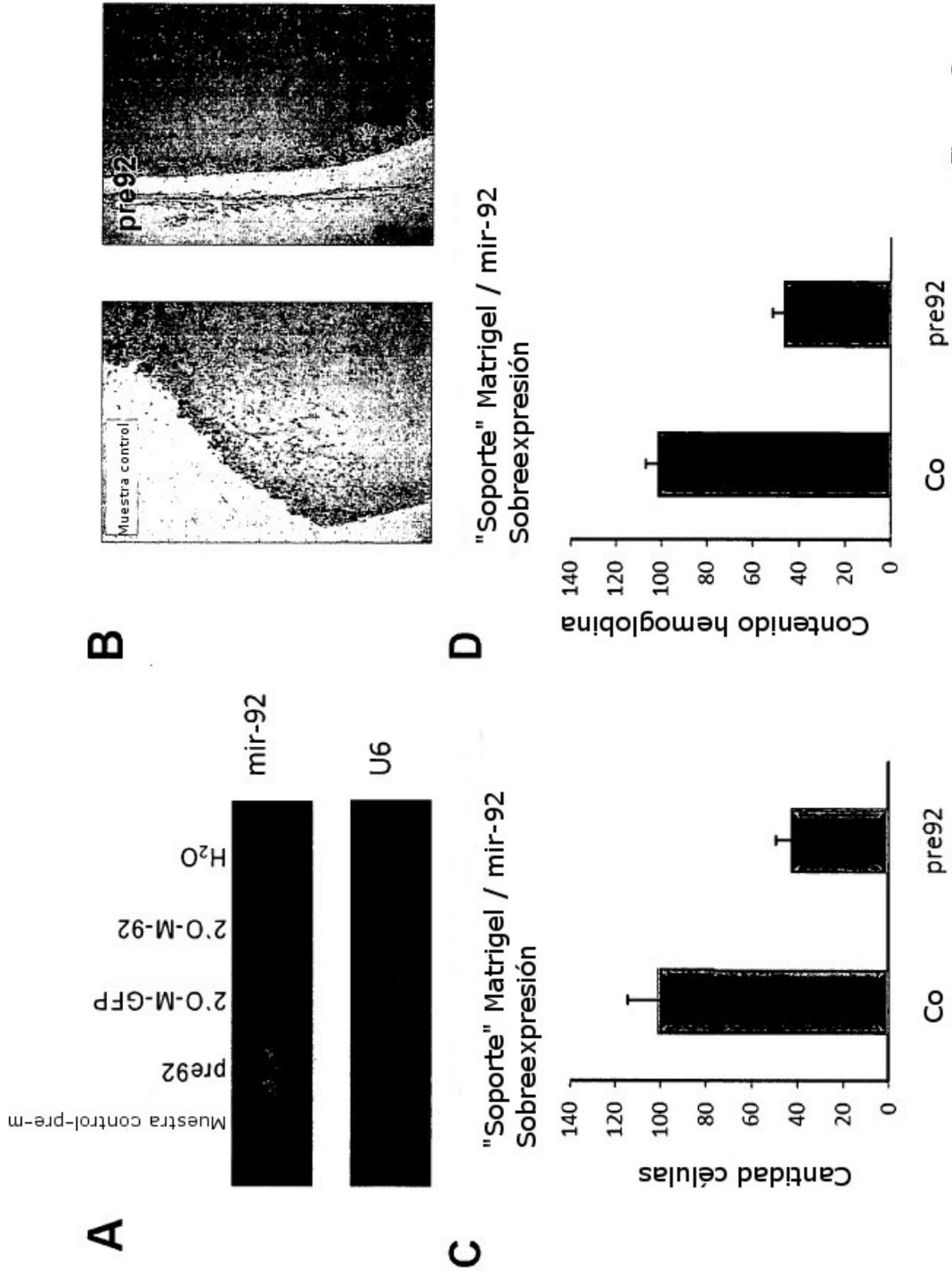
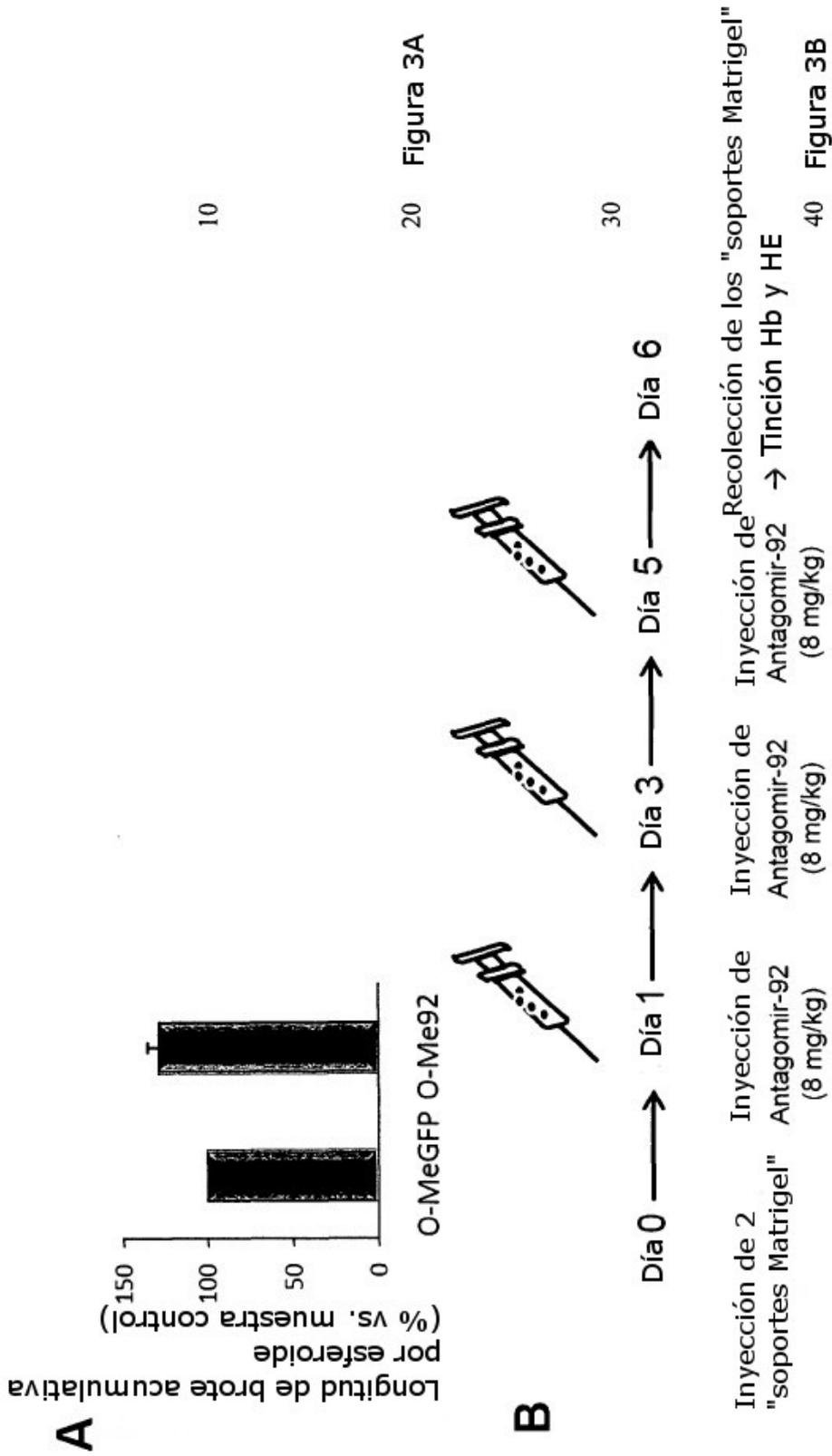


Figura 2



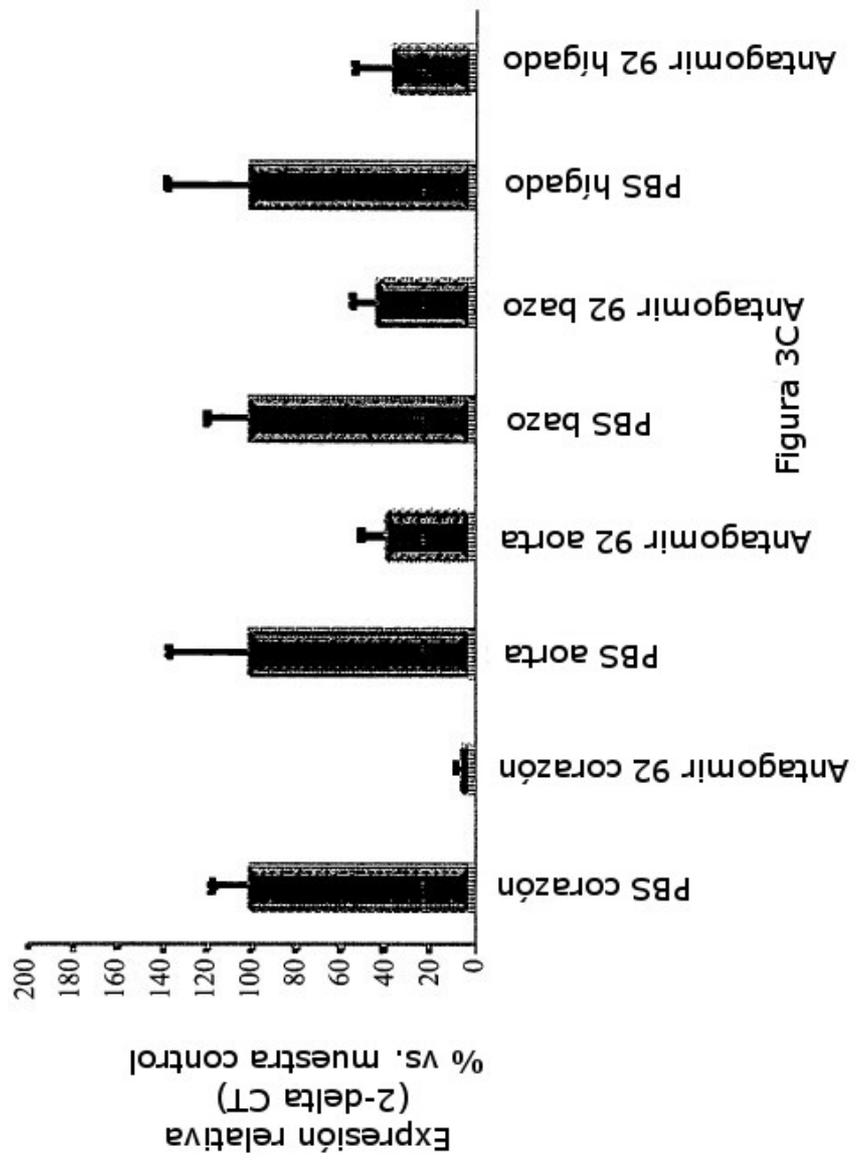


Figura 3C

3

E

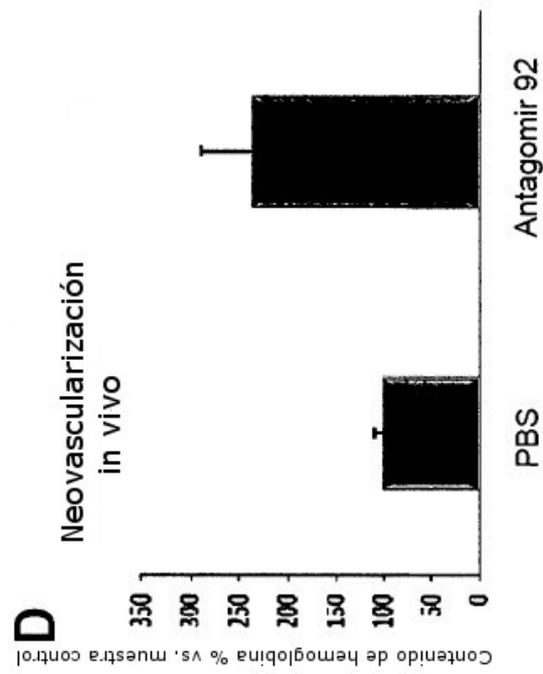


Figura 3D

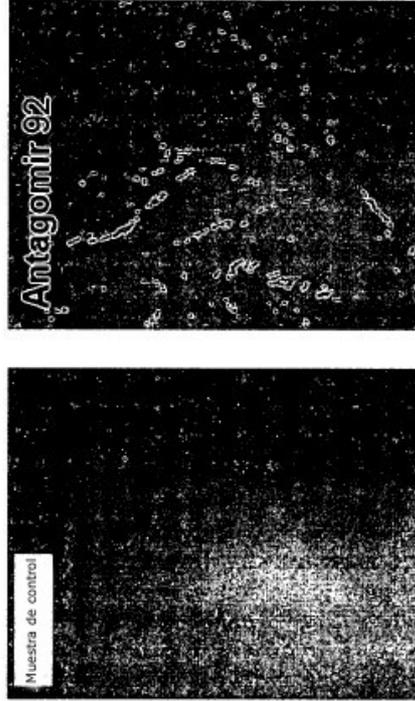


Figura 3E

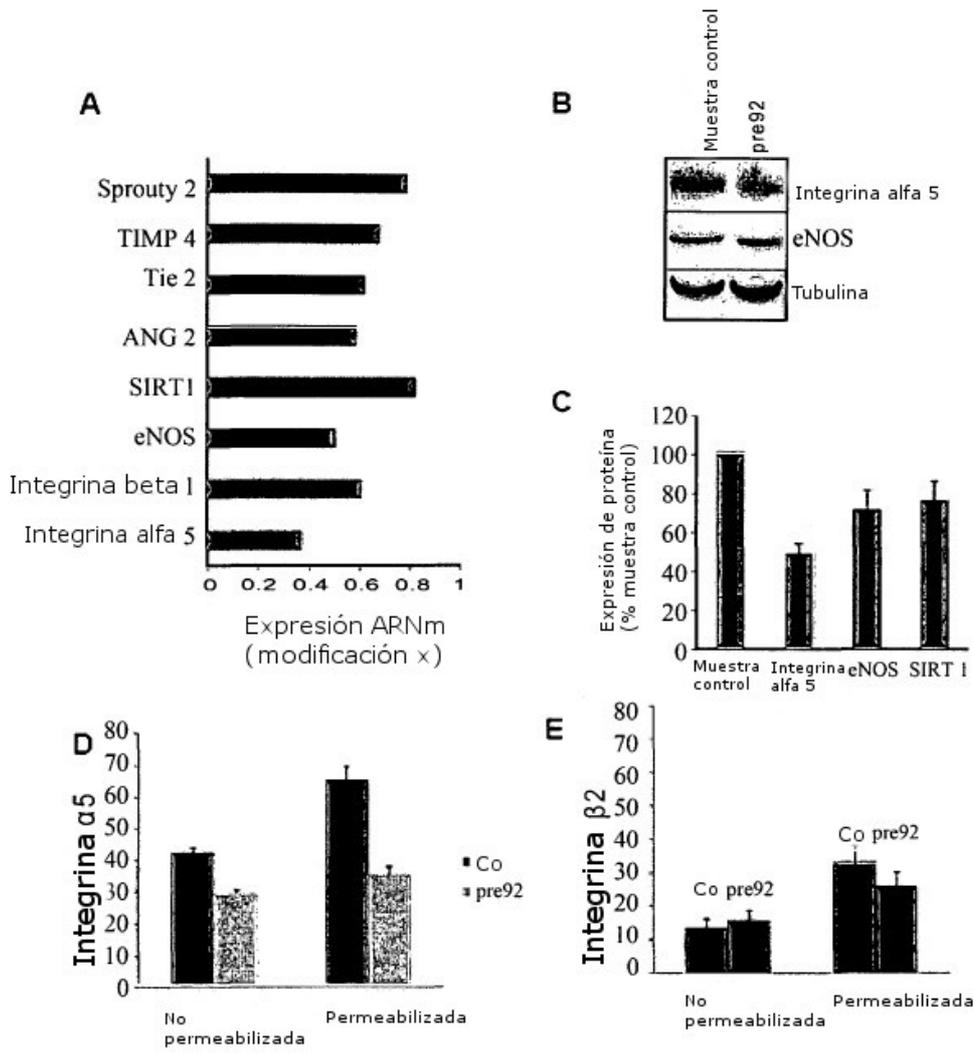


Figura 4

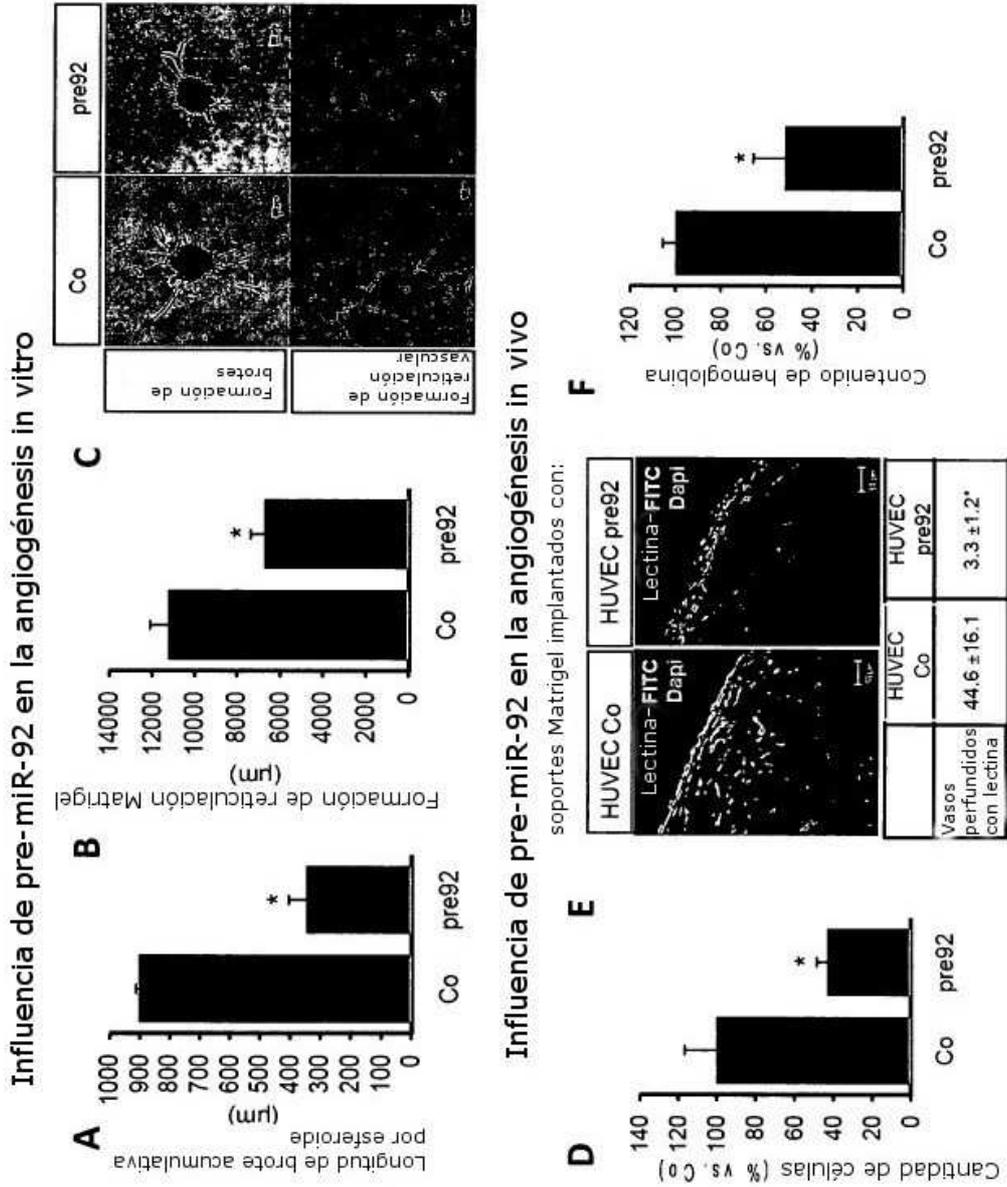


Figura 5

Figura 6

Influencia de inhibición miR-92a en la angiogenesis

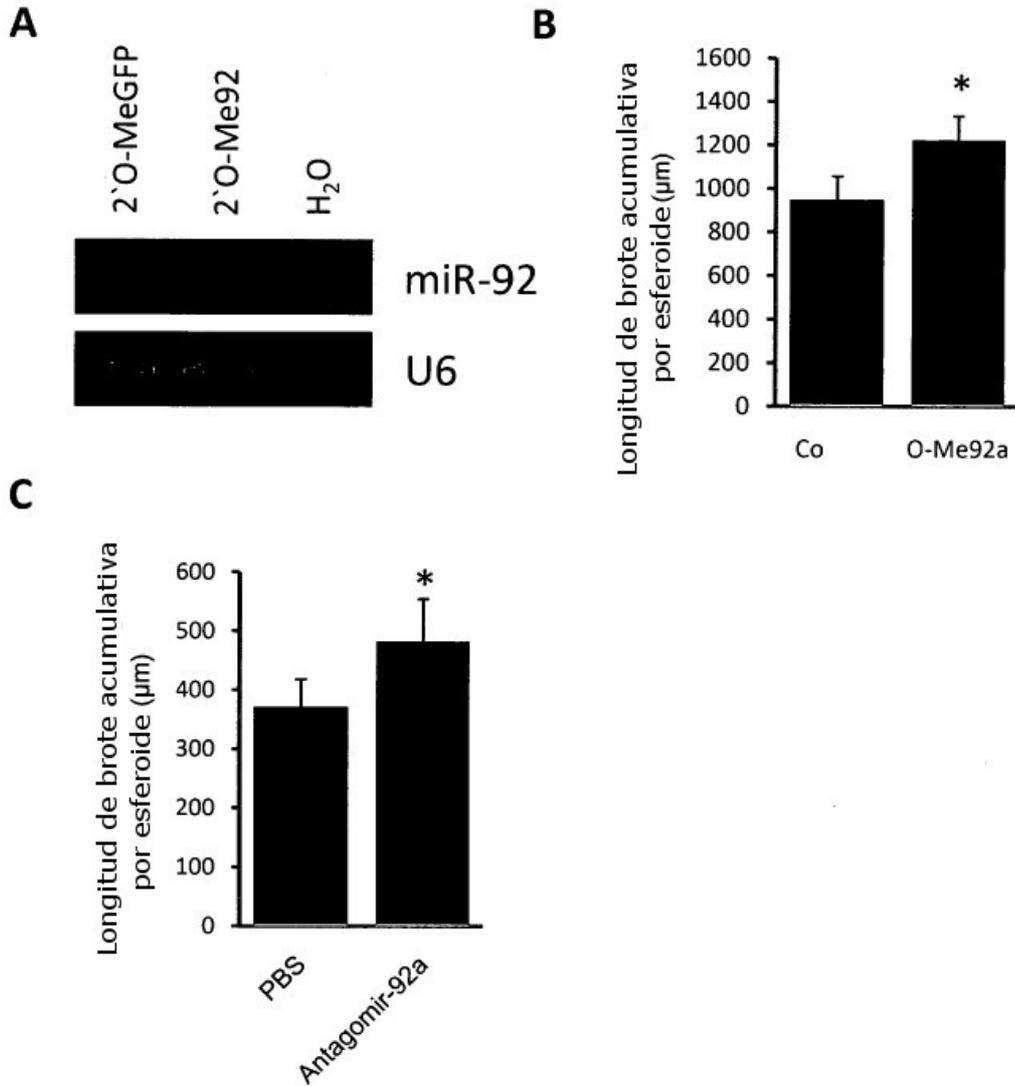


Figura 7

La inhibición de miR-92a mediante antagomir-92a mejora la formación nueva de vasos en el modelo de Matrigel y de isquemia de extremidad posterior

Influencia de antagomir-92a en el modelo de matriz

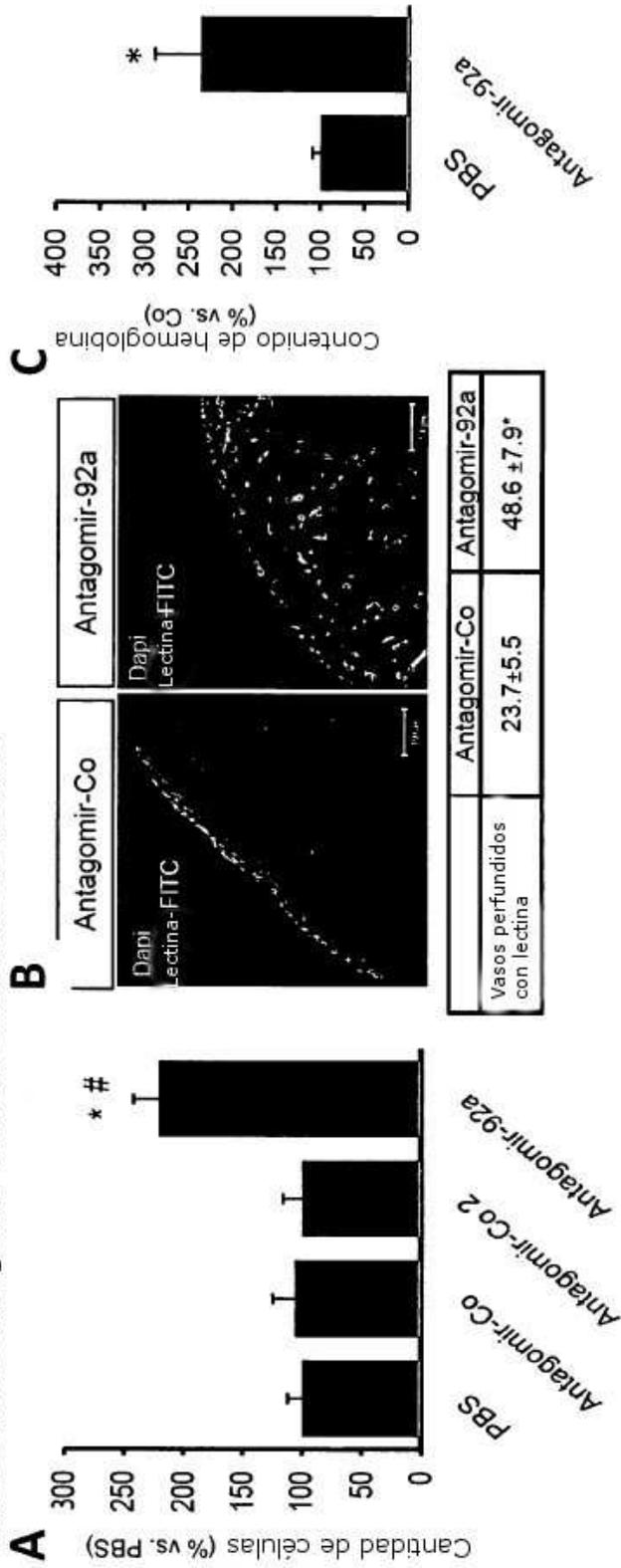


Figura 7 (continuación)

Influencia de antagomir-92a en el modelo de isquemia de extremidad posterior

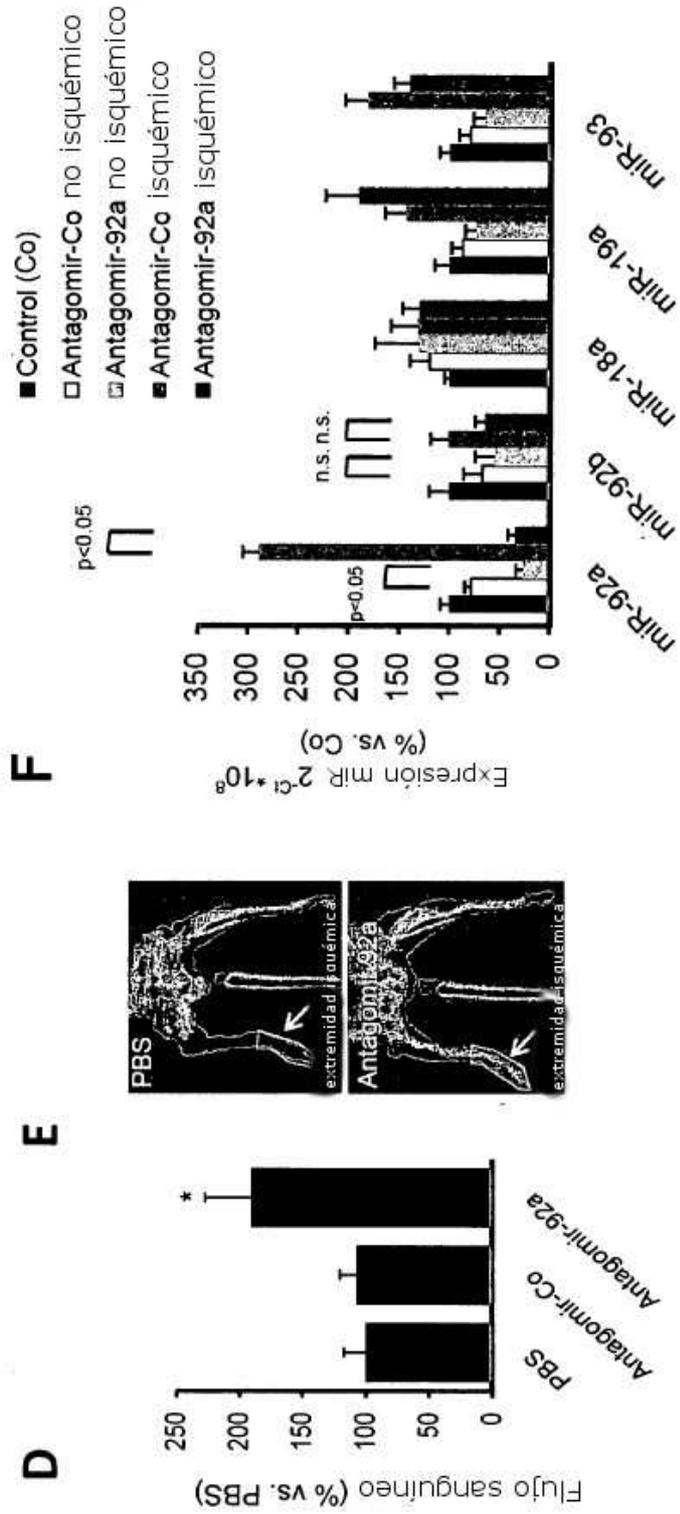


Figura 8

La inhibición de miR-92a mediante antagonir-92a mejora la función cardíaca tras infarto de miocardio

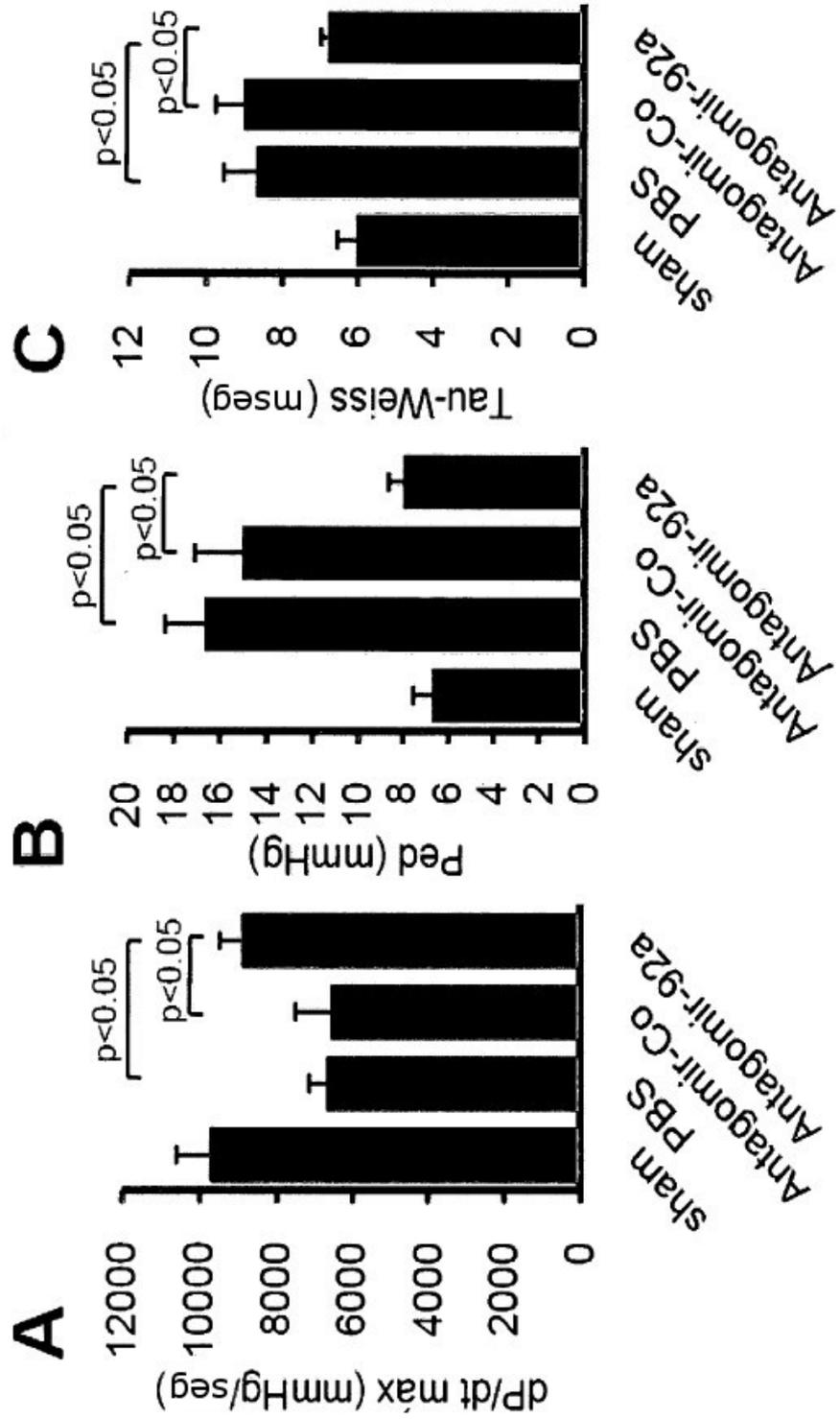


Figura 8 (continuación)

La inhibición de miR-92a mediante antagomir-92a mejora la función cardíaca tras infarto de miocardio

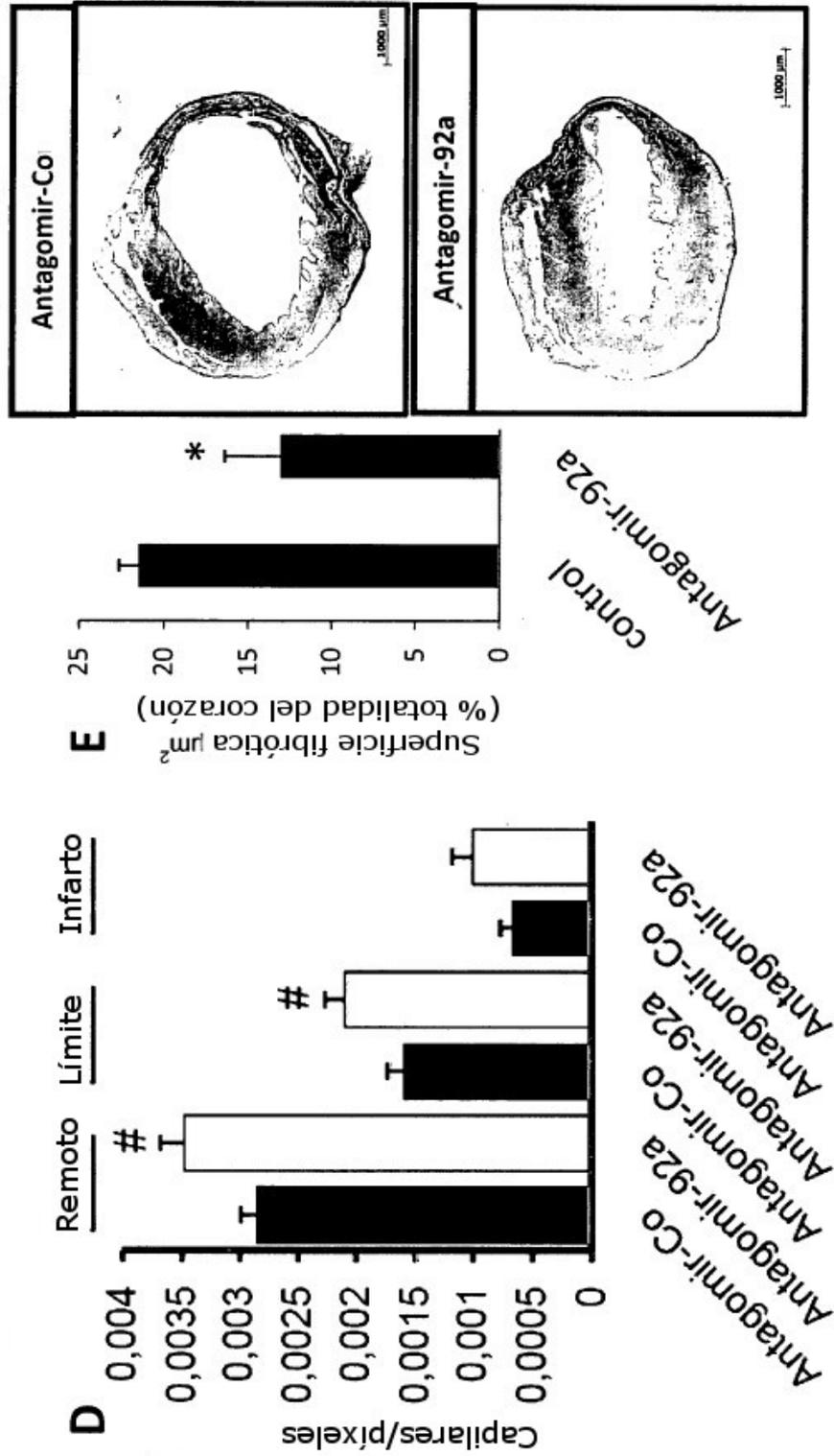


Figura 9

Influencia de miR-17, miR-18 y miR-19 en la angiogénesis

