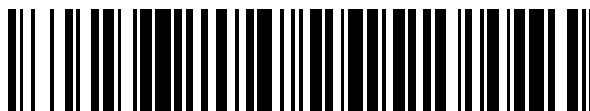


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 160**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/712 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2014 PCT/IB2014/058500**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO14115103**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2014 E 14706098 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2948551**

54 Título: **Composición que comprende un antagomir encapsulado**

30 Prioridad:

24.01.2013 EP 13305082

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

31.10.2018

73 Titular/es:

**PIERRE FABRE MÉDICAMENT S.A.S. (50.0%)
45 place Abel Gance
92654 Boulogne cedex, FR y
FUNDACIÓ HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'
HEBRON - INSTITUT DE RECERCA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ASIN, MIGUEL-ANGEL;
FERRET, EULALIA;
PEREZ, AMADEO;
GOTARDA, NEUS BELLERA;
RODRIGUEZ SINOVAS, ANTONIO;
VERT, IGNASI BARBA y
GARCIA-DORADO GARCIA, ANTONIO DAVID**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 688 160 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición que comprende un antagonista de la angiotensina encapsulado

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de las formulaciones farmacéuticas destinadas para la prevención o el tratamiento de trastornos cardíacos, incluyendo trastornos isquémicos cardíacos.

Antecedentes de la invención

El infarto agudo de miocardio (IAM), también denominado infarto de miocardio y comúnmente conocido como un ataque al corazón, representa un riesgo importante para la salud en la mayoría de los países industrializados de todo el mundo y sigue siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo.

10 Generalmente, el IAM es causado por una carencia repentina y prolongada de circulación sanguínea al tejido del corazón que normalmente es el resultado de un estrechamiento u oclusión de una arteria coronaria. Sin el riego sanguíneo adecuado, el tejido se vuelve isquémico, lo que lleva a la muerte de los cardiomiocitos (células del músculo cardíaco) y estructuras vasculares.

15 Ha habido muchos avances en el tratamiento del IAM en las últimas décadas, principalmente con relación a la reperfusión coronaria conjuntamente con la terapia farmacológica. La terapia de reperfusión ha logrado cambiar la progresión natural del IAM reduciendo el área infartada y mejorando la morbilidad y la mortalidad a corto plazo y a largo plazo. Sin embargo, existen limitaciones sustanciales en el uso de las dos estrategias de reperfusión disponibles en la actualidad: la fibrinólisis da como resultado un bajo grado de permeabilidad coronaria y la angioplastia primaria no se puede aplicar frecuentemente durante las primeras horas de evolución del IAM. Además, en algunos pacientes cateterizados, ocurre el fenómeno de "no reflujo" o ausencia de reperfusión microvascular a pesar del flujo epicárdico normal, que da como resultado resultados funcionales adversos. Esto significa que la terapia de reperfusión no ha prevenido la aparición de remodelación perjudicial del miocardio, un complejo proceso de reparación intrínseca de la formación de cicatrices de colágeno que da como resultado la dilatación ventricular, disfunción contráctil y la posterior insuficiencia cardíaca. Su aparición, en aproximadamente 30 % de los IAM, se ha asociado principalmente a un mayor tamaño del infarto, obstrucción microvascular y reacciones de reparación desfavorables aún poco entendidas.

25 Puesto que la fibrosis reparativa y la recuperación funcional de los tejidos isquémicos dependen del establecimiento de redes que suministran sangre oxigenada, se han hecho esfuerzos para mejorar el lecho vascular mediante la inducción de la neoangiogénesis en el área de cicatrización para lograr la conversión directa de las áreas lesionadas al tejido funcional *in situ*.

30 La inducción terapéutica de la angiogénesis podría atenuar la aparición de este fenómeno. No obstante, los resultados de varios años de ensayos clínicos con factores proangiogénicos intravenosos han sido insatisfactorios. Sin estar ligado por una teoría, se considera que una de las razones que explican este fracaso puede ser que la vía intravenosa puede no ser capaz de alcanzar y mantener una concentración eficaz de fármaco en el tejido diana para promover y mantener una red vascular funcional en condiciones cardíacas gravemente comprometidas.

35 A fin de abordar este problema y prevenir la insuficiencia cardíaca post-IAM, se inició en la última década la investigación sobre la posibilidad de regenerar el músculo cardíaco y los vasos. Los estudios iniciales que administran las células progenitoras pluripotentes y que infunden factores de crecimiento vascular mostraron resultados prometedores, pero la traducción en el entorno clínico mostró incapacidad de estas terapias para regenerar la neovasculatura de una manera adecuada para permitir que se recupere el músculo cardíaco destruido.

Hoy en día, la angiogénesis y la repoblación del corazón dañado con la terapia celular, así como los fármacos específicos y la terapia de resincronización, pueden disminuir la progresión de este fenómeno, pero la prevención de su manifestación sigue siendo un reto dudoso para la medicina cardíaca. Por tanto, se requieren novedosas estrategias de tratamiento que prevengan la remodelación ventricular izquierda adversa.

45 Sumario de la invención

La presente invención se refiere al tratamiento de trastornos cardíacos, preferentemente isquémicos, administrando una composición que invierte o previene la remodelación ventricular mediante la modulación de la actividad o expresión de microARN. Más particularmente, la invención proporciona una composición que comprende un inhibidor de un microARN involucrado en la angiogénesis, siendo dicho inhibidor incorporado preferentemente en un nuevo vehículo de administración capaz de liberar el inhibidor localmente al tejido diana isquémico. Además, la invención proporciona un método de inversión o prevención de la remodelación ventricular y kits útiles para dicho método.

50 La presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de un miARN involucrado en la angiogénesis y presentación de una actividad antiangiogénica, o su precursor, en la que

dicho inhibidor es un oligonucleótido antisentido que es complementario a dicho miARN, o su precursor, en el que dicho inhibidor se microencapsula en microesferas poliméricas biodegradables y biocompatibles, en el que dichas microesferas están hechas de un copolímero seleccionado de entre poli-d,l-lactida (PLA) y poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA), combinándose dicho polímero opcionalmente con uno o varios de otros polímeros.

- 5 En algunas realizaciones de la composición descrita anteriormente, dicho miARN se selecciona de la familia que comprende miR-92 (incluyendo miR-92a-1, miR-92a-2 y miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (incluyendo miR-16-1 y miR-16-2), miR-374 (incluyendo miR-374a, miR-374b y miR-374c), miR-24 (incluyendo miR-24-1 y miR-24-2), miR-483, miR-34 (incluyendo miR-34a, miR-34b y miR-34c), miR-20 (incluyendo miR-20a y miR-20b), miR-15 (incluyendo miR-15a y miR-15b).
- 10 En algunas realizaciones de la composición descrita anteriormente, dicho inhibidor de un miARN es un oligonucleótido de 8-49 nucleótidos de longitud que tiene una secuencia dirigida a dicho miARN, o su precursor. En ciertas realizaciones, dicho oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido que es al menos parcialmente complementario a la secuencia del miARN diana, o su precursor. Dicho oligonucleótido antisentido se puede seleccionar del grupo que consiste en un ribonucleótido, un desoxirribonucleótido, un ARN pequeño, un antagomir, un LNA, un CDNA, un PNA, un oligonucleótido de morfolino o una combinación de los mismos.
- 15 En algunas realizaciones de la composición descrita anteriormente, dicho inhibidor de un miARN consiste en un antagomir, y preferentemente consiste en un antagomir que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos 16 nucleótidos contiguos complementarios a los nucleótidos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 1 a 58 descritas en el presente documento.
- 20 En algunas realizaciones de la composición descrita anteriormente, dicho inhibidor de un miARN consiste en un antagomir que comprende la secuencia SEQ ID NO. 59 o 60 y modificaciones que excluyen sustituciones de bases de la misma, y fragmentos que consisten en subsecuencias de SEQ ID NO: 59 o 60 de al menos 8 nucleótidos contiguos de la misma.
- 25 En algunas realizaciones de la composición descrita anteriormente, dichas microesferas presentan un diámetro que no supera 25 µm, que engloba microesferas que tienen un diámetro comprendido entre 5 y 20 µm, preferencialmente entre 5 y 15 µm.

En algunas realizaciones de la composición descrita anteriormente, dichas microesferas están hechas de un polímero que consiste en poli-d,l-lactida (PLA), combinándose dicho polímero opcionalmente con uno o varios de otros polímeros.

- 30 La presente invención también se refiere a un método de inversión o prevención de la remodelación ventricular en un sujeto en necesidad de la misma que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una composición como se ha descrito anteriormente.

La presente invención también se refiere a una población de microesferas biodegradables y biocompatibles para su uso en el tratamiento o la prevención de infarto de miocardio, en la que dichas microesferas:

- 35 - tienen un diámetro promedio comprendido entre 5 y 20 µm, preferencialmente entre 5 y 15 µm;
- están hechas de poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA); poli-d,l-lactida (PLA) o una mezcla de las mismas;
- incorporan desde 1 % hasta 15 % p/p de un agente terapéutico capaz de prevenir la remodelación ventricular,

- 40 en la que dicho agente terapéutico consiste en un inhibidor de un miARN seleccionado del grupo que consiste en miR-92 (incluyendo miR-92a-1, miR-92a-2 y miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (incluyendo miR-16-1 y miR-16-2), miR-374 (incluyendo miR-374a, miR-374b y miR-374c), miR-24 (incluyendo miR-24-1 y miR-24-2), miR-483, miR-34 (incluyendo miR-34a, miR-34b y miR-34c), miR-20 (incluyendo miR-20a y miR-20b), miR-15 (incluyendo miR-15a y miR-15b) y más preferencialmente miR-92a, o su precursor.

Descripción de las figuras

- 45 La Figura 1 ilustra la morfología de microesferas de antagomir-92a - PLGA determinada por microscopía electrónica de barrido;
- la Figura 2 ilustra la distribución de tamaños de las microesferas de antagomir-92a - PLGA determinada por dispersión de la luz láser;
- 50 la Figura 3 ilustra los efectos en la hemodinámica y contractibilidad ventricular izquierda por inyecciones repetidas de microesferas de hasta 120 mg;
- la Figura 4 ilustra los efectos en la hemodinámica y contractibilidad ventricular izquierda por inyecciones repetidas de microesferas de hasta 240 mg;

la Figura 5 ilustra el protocolo del estudio del efecto molecular de una única inyección intracoronaria de microesferas según la invención;

la Figura 6 ilustra la especificidad de la inhibición de miR-92a por las microesferas según la invención;

5 la Figura 7 ilustra que antagomir-92a encapsulado induce angiogénesis en tejido infartado. La densidad vascular en la zona infartada, calculada dividiendo el número total de vasos entre el área infartada total. N=20. * P<0,01;

Figura 8: Medición indirecta. Índice de resistencia microvascular basal y mínimo medido un mes después del IAM, en la arteria relacionada con el infarto de minicerdos tratados con antagomir-92a encapsulado, placebo o solución salina. (a) Se calculó el índice de resistencia microvascular basal (IRM) multiplicando la presión (mmHg) evaluada con un alambre de presión situado en la LAD apical (Pd) y se cuantificó el flujo coronario (ml/min) por un sensor situado en el segmento distal de LAD. Se calculó el índice de resistencia microvascular mínimo (IRM_{hip}) con los mismos parámetros medidos en hiperemia máxima alcanzada con infusión intravenosa de 140 micro/kg/min de adenosina administrada a través de la camisa 12F de la vena femoral. n= 12 * p<0,01 ** p=0,05 (b) Correlación entre el número total de vasos en el área necrótica e IRM. R² 0,41, p=0,02, n=12. (c) Correlación entre el número total de vasos en el área necrótica e IRM mínimo. R² 0,27, p=0,08, n=12;

15 Figura 9: Medición directa. Resistencia microcirculatoria inicial y verdadera medida un mes después del IAM en la arteria relacionada con el infarto de minicerdos tratados y no tratados con antagomir-92a encapsulado. (a) Se calculó la resistencia microcirculatoria inicial (RM inicial) dividiendo la presión (mmHg) evaluada con un hilo de presión situado en la LAD apical (Pd) por flujo coronario (ml/min) cuantificado por un sensor situado en el segmento distal de la LAD. La RM inicial fue significativamente más baja en el grupo tratado en comparación con los controles (7,47 ± 1,33 frente a 19,62 ± 2,98, p=0,005). n=13. Se calculó la resistencia microcirculatoria verdadera (RMV (hip)) midiendo los mismos parámetros durante la hiperemia máxima alcanzada con infusión intravenosa de 140 micro/kg/min de adenosina administrada a través de la camisa 12F de la vena femoral. Se observó RMV (hip) significativamente más baja en el grupo tratado en comparación con los controles (5,0 ± 1,15 frente a 14,49 ± 2,4, p= 0,006). n= 13 (b) Correlación entre la densidad vascular en toda el área necrótica y RM inicial. R²=0,35, P=0,033, n=13. (c) Correlación entre la densidad vascular en toda el área necrótica y RMV (hip). R²=0,31, P=0,047. n=13.

20 Figura 10: Un mes después del IAM, se evaluó la presencia de discinesia septoapical por un ecocardiógrafo desconocedor del tratamiento asignado. Se muestra el porcentaje de animales con discinesia septoapical en los animales tratados y no tratados (83,3 % frente a 16,7 %, p=0,03). n=20.

30 Figura 11: Evaluación de los efectos de antagomir 92a encapsulado y antagomir 92a no encapsulado en la expresión de miR92a *in vitro*.

Figura 12: Efecto de los antagomires 17 y 20a encapsulados sobre sus miARN respectivos.

Descripción detallada de la invención

A continuación se dan algunas definiciones que son relevantes en lo que respecta a la descripción de todas las realizaciones que están englobadas por la presente invención.

35 MicroARN (miR) son ARN no codificantes pequeños que están surgiendo como reguladores cruciales de los procesos biológicos.

"MicroARN", "miARN" o "miR" significa un ARN no codificante de aproximadamente 18 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. Estos miR podrían provenir de múltiples orígenes que incluyen: un gen individual que codifica un miARN, de intrones de gen codificante de proteína, o de transcrito policistrónico que frecuentemente codifica múltiples microARN estrechamente relacionados.

40 El actual conocimiento muestra que los miARN se transcriben por ARN polimerasa II (pol II) o ARN polimerasa III (pol III) y surgen de transcritos iniciales, denominados transcritos de miARN primarios (pri-miARN), que generalmente tienen varios miles de bases de longitud. Los pri-miARN se procesan en el núcleo por la RNasa Drosha en precursores con firma de horquilla de aproximadamente 70 a 100 nucleótidos (pre-miARN). Tras el transporte al citoplasma, el pre-miARN de horquilla se procesa adicionalmente por Dicer para producir un microARN bicatenario; una de las cadenas, el denominado microARN maduro (algunas veces se pueden usar ambas cadenas), se incorpora entonces en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), donde se asocia con su ARNm diana por complementariedad de pares de bases. En los casos relativamente raros en los que una base de miARN se aparea perfectamente con una diana de ARN mensajero (ARNm), se promueve la degradación de ARNm. Más comúnmente, los microARN forman heterodúplex imperfectos con ARNm diana, que o bien afectan la estabilidad del ARNm o bien inhiben la traducción de ARNm.

50 "Secuencia de tallo-bucle" significa un ARN que tiene una estructura de horquilla y que contiene una secuencia de microARN madura. Se pueden solapar las secuencias de pre-miARN y las secuencias de tallo-bucle. Ejemplos de secuencias de tallo-bucle se encuentran en la base de datos de microARN conocida como miRBase.

"Precursor de microARN" significa un transcrito que se origina de un ADN genómico y que comprende un ARN estructurado no codificante que comprende una o más secuencias de microARN. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un precursor de microARN es un pre-miARN. En ciertas realizaciones, un precursor de microARN es un pri-miARN.

5 La siguiente memoria descriptiva seguirá el sistema de nomenclatura estándar, refiriéndose "mir-X" en minúsculas al pre-miARN, mientras que "miR-X" en mayúsculas se refiere a la forma madura. Cuando se originan dos microARN maduros de brazos opuestos del mismo pre-miARN, se indican con un sufijo -3p o -5p. Cuando se conocen los niveles de expresión relativos, un asterisco tras el nombre indica un microARN expresado a bajos niveles con respecto al microARN en el brazo opuesto de una horquilla.

10 En la siguiente memoria descriptiva, a menos que se especifique de otro modo, el uso de la expresión miR-X se refiere al miARN maduro, que incluye tanto las formas -3p como -5p, si las hay.

Para evitar dudas, en la presente memoria descriptiva, las expresiones microARN, miARN y miR designan el mismo producto.

15 En el contexto de la presente invención, es un objetivo modular la angiogénesis o procesos angiogénicos con, como consecuencia, un enfoque particular en el microARN involucrado en la angiogénesis. Así, es un objetivo de la invención modular al menos un microARN que pertenece a una familia de microARN involucrada en la modulación de la angiogénesis.

20 Por la expresión "familia de microARN" se prevé un grupo de microARN con una función relacionada que consiste en la modulación de la angiogénesis o procesos angiogénicos. Más particularmente, sin limitación, dichos microARN se seleccionan del grupo que consiste en microARN que presentan una actividad antiangiogénica.

25 Más particularmente, sin limitación, dichos microARN se seleccionan del grupo que consiste en miR-92 (incluyendo miR-92a-1, miR-92a-2 y miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (incluyendo miR-16-1 y miR-16-2), miR-374 (incluyendo miR-374a, miR-374b y miR-374c), miR-24 (incluyendo miR-24-1 y miR-24-2), miR-483, miR-34 (incluyendo miR-34a, miR-34b y miR-34c), miR-20 (incluyendo miR-20a y miR-20b), miR-15 (incluyendo miR-15a y miR-15b), o sus precursores. Como será obvio para el experto en la técnica, cualquier miARN que tenga propiedades de modulación, preferencialmente antagonistas, sobre la angiogénesis se debe considerar parte de esta familia de microARN.

Para evitar dudas, la expresión microARN en la siguiente memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario, se debe referir al ARN maduro o procesado después de que se hay escindido de su precursor. Para las formas no maduras, se usará la expresión "precursores" o "precursores de microARN".

30 La siguiente Tabla 1 reagrupa las diferentes secuencias de los precursores de microARN englobados por la presente memoria descriptiva.

Tabla 1

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
1	mir-92a-1	CUUUCUACACAGGUUGGGGAUCGGUUGCAAUGCUGUGUUUCUGUAUGGUAUUG CACUUGUCCCCGGCCUGUUGAGUUUGG
2	mir-92a-2	UCAUCCUGGGUGGGGAUUGUUGCAUUACUUGUGUUCUAUAUAAAAGUAUUG CACUUGUCCCCGGCCUGUGGAAGA
3	mir-92b	CGGGCCCCGGGCGGGCGGGAGGGACGGGACGGGUGCAGUGUUGUUUUUCC CCCCCAAUAUUGCACUCGUCCCCGGCCUCCGGCCCCCCCCGGCCC
4	mir-17	GUCAGAAUAUUGUCAAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGUGAUUUGUGCAUCUAC UGCAGUGAAGGCACUUGUAGCAUUAUGGUGAC
5	mir-503	UGCCCUAGCAGCGGGAACAGUUCUGCAGUGAGCGAUCCGGUGCUCUGGGGUAU UGUUUCCCGUGCCAGGGUA
6	mir-16-1	GUCAGCAGUGCCUAGCAGCACGUAAAUAUUGCGUUAAGAUAUAAAUAUUA UCUCCAGUAUUAACUGUGCUGCUGAAGUAAGGUUGAC
7	mir-16-2	GUUCCACUCUAGCAGCACGUAAAUAUUGGCGUAGUGAAAUAUAUUAUAAACA CCAAUAUUAUCUGUGCUGCUUAGUGUGAC
8	mir-374a	UACAUCGGCCAUAUAUAACAACCUGAUAAGUGUUAUAGCACUUAUCAGAUU GUAUUGUAAUUGUCUGUGUA

ES 2 688 160 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia
9	mir-374b	ACUCGGAUGGAUUAUACAACCUGCUAAGUGUCCUAGCACUUAGCAGGUUG UAUUUAUCAUUGUCCGUGUCU
10	mir-374c	ACACGGACAAGUAUUAACAACCUGCUAAGUGCUAGGACACUUAGCAGGUUG UAUUUAUCCAUCGAGU
11	mir-24-1	CUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUUACAGUUCUCAUUUUACACACUGGCUCAGU UCAGCAGGAACAGGAG
12	mir-24-2	CUCUGCCUCCCGUGCCUACUGAGCUGAAACACAGUUGGUUUGUGUACACUGG CUCAGUUCAGCAGGAACAGGG
13	mir-483	GAGGGGAAGACGGGAGGAAAGAAGGGAGUGGUUCCAUCACGCCUCCUCACU CCUCUCCUCCGUCUUCUCCUCUC
14	mir-34a	GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGUUGUGAGCAA UAGUAAGGAAGCAAUCAGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUG GGGCC
15	mir-34b	GUGCUCGGUUUGUAGGCAGUGUCAUUAGCUGAUUGUACUGUGGUGGUACAA UCACUAAUCCACUGCCAUCAAACAAGGCAC
16	mir-34c	AGUCUAGUUACUAGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGCUAAUAGUACCAAUCACU AACCACACGGCCAGGUAAAAGAUU
17	mir-20a	GUAGCACUAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAGUGUUAGUUACUACUGCAUUA UGAGCACUUAAGUACUGC
18	mir-20b	AGUACCAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAGUUUGGCAUGACUCUACUGUAGUA UGGGCACUCCAGUACU
19	mir-15a	CCUUGGAGUAAAGUAGCAGCACAUAAUGGUUUUGGGAUUUUGAAAAGGUGCA GGCCAUAAUUGUGCUGCCUAAAAUACAAGG
20	mir-15b	UUGAGGCCUUAAGUACUGUAGCAGCACAUCAUGGUUUACAUGCUACAGUCA AGAUGCGAAUCAUUAUUUGCUGCUCUAGAAAUUUAAGGAAAUCAU

La siguiente Tabla 2 indica, para cada microARN, las secuencias del microARN y los restos correspondientes en las secuencias de precursor correspondientes (véase la Tabla 1).

Tabla 2

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia	Restos del precursor
21	miR-92a-3p	uauugcacuuguccggccugu	48-69
22	miR-92a-1-5p	agguugggaucgguugcaaugcu	11-33
23	miR-92a-2-5p	ggguggggaauuguugcauuac	9-30
24	miR-92b-3p	uauugcacucguccggccucc	61-82
25	miR-92b-5p	agggacgggacgugcagug	20-41
26	miR-17-3p	acugcagugaaggcacuuguag	51-72
27	miR-17-5p	caaagugcuacagucagguag	14-36
28	miR-503-3p	ggguauuguuuccgugccagg	46-68
29	miR-503-5p	uagcagcgggaacaguucugcag	6-28
30	miR-16-1-3p	ccaguauuaacugucugcuga	56-77
31	miR-16-2-3p	ccaauuuacugucugcuua	53-74

ES 2 688 160 T3

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia	Restos del precursor
32	miR-16-5p	uagcagcacguaaaauuggcg	14-35 (para miR-16-1) o 10-31 (para miR-16-2)
33	miR-374a-3p	cuuaucauguuauuguaauu	42-63
34	miR-374a-5p	uuauaaauacaaccugauagug	12-33
35	miR-374b-3p	cuuagcagguuguauuaucauu	41-62
36	miR-374-5p	auauaaauacaaccugcuaagug	11-32
37	miR-374c-3p	cacuuagcagguuguauuauau	39-60
38	miR-374c-5p	auaaauacaaccugcuaagugcu	13-34
39	miR-24-1-3p	uggcucaguucagcaggaacag	44-65
40	miR-24-1-5p	ugccuacugagcugauaucagu	7-28
41	miR-24-2-3p	uggcucaguucagcaggaacag	50-71
42	miR-24-2-5p	ugccuacugagcugaaacacag	13-34
43	miR-483-3p	ucacuccucuccccgucuu	48-68
44	miR-483-5p	aagacgggaggaaagaaggag	8-29
45	miR-34a-3p	caaucagcaaguauacugcccu	64-85
46	miR-34a-5p	uggcagugucuuagcugguugu	22-43
47	miR-34b-3p	caucacuaacuccacugccau	50-71
48	miR-34b-5p	uaggcagugucuuagcugauug	13-35
49	miR-34c-3p	aaucacuaaccacacggccagg	46-67
50	miR-34c-5p	aggcaguguaguauagcugauugc	13-35
51	miR-20a-3p	acugcauuauagagcacuuaaag	44-65
52	miR-20a-5p	uaaagugcuuauagucagguag	8-30
53	miR-20b-3p	acuguaguaugggacuuuccag	44-65
54	miR-20b-5p	caaagugcucuuagucagguag	6-28
55	miR-15a-3p	caggccauauugugcugccuca	51-72
56	miR-15a-5p	uagcagcacauaaugguuugug	14-35
57	miR-15b-3p	cgaaucauuuuugcugcucua	58-79
58	miR-15b-5p	uagcagcacaucaugguuuaca	20-41

A menos que se indique lo contrario, secuencias de precursor y de microARN a las que se hace referencia en la solicitud son secuencias humanas. Sin embargo, en algunos casos, las secuencias de microARN humanas son homólogas a secuencias de microARN de otras especies.

- 5 Como un ejemplo, se puede mencionar aquí que miR-92a humano es homólogo a miR de otras especies. Más particularmente, miR-92a humano es homólogo a miR de *dme* (*Drosophila melanogaster*), *mmu* (*Mus musculus*), *rno* (*Rattus norvegicus*), *dps* (*Drosophila pseudoobscura*), *aga* (*Anopheles gambiae*), *dre* (*Danio rerio*), *mml* (*Macaca mulatta*), *xtr* (*Xenopus tropicalis*), *ame* (*Apis mellifera*), *odi* (*Oikopleura dioica*), *cin* (*Ciona intestinalis*), *csa* (*Ciona savignyi*), *cfa* (*Canis familiaris*) y cerdo o *ssc* (*Sus scrofa*).

Basándose en su conocimiento general, el experto en la técnica encontrará fácilmente la homología entre otras secuencias de microARN humanas y secuencias de microARN de otras especies.

5 Las secuencias de nucleótidos de microARN maduros y sus secuencias de tallo-bucle correspondientes descritas en el presente documento son las secuencias encontradas en miRBase, una base de datos que se puede buscar en línea de secuencias y anotación de microARN. Las entradas en la base de datos de secuencias miRBase representan una porción de horquilla predicha de un transcrito de microARN (el tallo-bucle), con información sobre la localización y secuencia de la secuencia de microARN madura. Las secuencias de tallo-bucle de microARN en la base de datos no son estrictamente miARN de precursor (pre-miARN), y en algunos casos pueden incluir el pre-miARN y alguna secuencia flanqueante del supuesto transcrito primario.

10 Así, es un objetivo de la presente invención proporcionar composiciones para el tratamiento o la prevención de la remodelación ventricular después del IAM que comprende un inhibidor de microARN, o una combinación de inhibidores de varios microARN, involucrado en diferentes reacciones que gobiernan la fisiología de la angiogénesis, o sus precursores.

15 Sin embargo, en la mayoría de los estudios publicados, se usa la vía intravenosa para administrar inhibidores de microARN en animales. La manipulación del microARN involucrado en la regulación de la expresión de genes vasculares representa una novedosa diana terapéutica en la enfermedad isquémica. Dentro del sector biomédico, ha habido un aumento exponencial en la investigación sobre la administración de moduladores de ARN, especialmente diseñados para inhibir una secuencia de ARN particular.

20 Dimmeler et al. han mostrado mejora en la contractilidad y recuperación de la función ventricular izquierda después de la inhibición de miR-92a por el inhibidor de microARN específico administrado por vía sistémica. Puesto que la agrupación policistrónica 17-92a de microARN se ha asociado a tumorigénesis y debido a la ubicuidad de tipo celular de microARN, la administración intravenosa en inyecciones repetitivas de miR o anti-miR plantea problemas en cuanto a la seguridad.

25 Debido al hecho de que los microARN controlan procesos complejos y están presentes en diversas vías celulares, es altamente probable que también desencadenen efectos secundarios significativos. Un problema, entre otros, es actualmente que los tratamientos con inhibidores de miARN no son selectivos.

30 Además, dada la ubicuidad y la baja especificidad por órgano de estas moléculas, la administración sistémica podría conducir a funciones reguladoras del ejercicio en tejidos donde estos miARN tienen diferentes funciones específicas de célula o donde no se expresan normalmente. Esta regulación errónea conduciría probablemente a desencadenar efectos secundarios. Entre los posibles riesgos, la tumorigénesis asociada con la manipulación de microARN sigue siendo uno de los problemas principales cuando se aplica esta terapia a la patología humana. Además, con el fin de obtener una concentración sostenida adecuada en las células diana, los inhibidores de microARN se deben inyectar repetidamente a dosis muy altas. Aunque la experimentación en animales pequeños en condiciones controladas tiene limitaciones menores, la transposición a los seres humanos presupone obstáculos a la bioseguridad, así como impedimentos logísticos y económicos.

35 Con el fin de resolver estos problemas y permitir que este nuevo enfoque terapéutico se transfiera a los pacientes, se considera generar un vehículo de suministro para transportar inhibidores de microARN y liberarlos directamente sobre el órgano diana. Un vehículo apropiado dirigiría el inhibidor de microARN directamente al tejido enfermo, permitiendo así una reducción en la dosificación, para evitar la administración de inyecciones repetidas y minimizar los efectos biológicos posiblemente no deseables a otros órganos.

40 El objetivo es, por tanto, mejorar la selectividad con el fin de evitar los efectos secundarios de estos tratamientos por medio de liberación de los inhibidores de microARN solo en el tejido diana. Este problema se resuelve, según la invención, por microencapsulación de los inhibidores de microARN en microesferas biodegradables y biocompatibles.

45 Así, es un objetivo de la presente invención proporcionar composiciones para el tratamiento o la prevención de la remodelación ventricular después de IAM que comprenden al menos un inhibidor microencapsulado de un microARN que pertenece a la familia de microARN relacionada con la modulación de la angiogénesis, familia de microARN que comprende, sin limitación, miR-92 (incluyendo miR-92a-1, miR-92a-2 y miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (incluyendo miR-16-1 y miR-16-2), miR-374 (incluyendo miR-374a, miR-374b y miR-374c), miR-24 (incluyendo miR-24-1 y miR-24-2), miR-483, miR-34 (incluyendo miR-34a, miR-34b y miR-34c), miR-20 (incluyendo miR-20a y miR-20b), miR-15 (incluyendo miR-15a y miR-15b), o su precursor.

50 Por la microencapsulación de los inhibidores de microARN en microesferas, se facilita la administración intrarterial después de la angioplastia transluminal, de manera que las microesferas se administran y solo se retienen en los microvasos, también denominados capilares, del área dañada; de esta forma, los inhibidores de microARN encapsulados se pueden liberar localmente.

55 La inyección intracoronaria a través de la arteria responsable del IAM permite la retención de las microesferas en la microcirculación coronaria y la liberación sostenida de los inhibidores de microARN directamente en el tejido

isquémico diana. Los inhibidores de microARN inducen la neoangiogénesis, que potencia la recuperación funcional de la contractilidad del tejido dañado, así como la favorable remodelación post-infarto.

Inesperadamente, se muestra en el presente documento que, cuando se microencapsula en microesferas apropiadas, un inhibidor de microARN y especialmente un inhibidor de un microARN que pertenece a la familia de microARN relacionada con la modulación de angiogénesis, dicho microARN se libera satisfactoriamente al área dañada del miocardio para bloquear la actividad biológica del microARN diana. Como se muestra en los ejemplos en el presente documento, la administración, por vía intracoronaria selectiva, de un inhibidor de microARN dado, es decir, como ejemplo no limitante un inhibidor de miR-92a, que se microencapsula en microesferas poliméricas biodegradables y biocompatibles a individuos que han sufrido un infarto de miocardio, conduce a la recuperación de la función miocárdica.

Por tanto, las microesferas retenidas en la microcirculación permiten la liberación sostenida del inhibidor de microARN directamente al tejido isquémico diana. El efecto sostenido de los inhibidores de microARN (también conocido como regulación por disminución) del microARN dirigido produjo un significativo crecimiento de vasos y la supresión de la remodelación adversa en el área de curación un mes después de la lesión.

Como se muestra en los ejemplos en el presente documento, se ha demostrado que la aparición de la remodelación ventricular adversa se puede prevenir induciendo vasculogénesis a través de la inhibición local y sostenida de un microARN que pertenece a la familia de microARN relacionada con la modulación de la angiogénesis por inhibidor de microARN apropiado encapsulado administrado en la arteria relacionada infartada. Esto representa un nuevo método de administración que facilitará la siguiente traducción de seguridad de la terapia de modulación génica a pacientes que sufren un infarto agudo de miocardio.

Estos resultados muestran claramente que una composición que comprende un inhibidor de microARN que pertenece a la familia de microARN relacionada con la modulación de angiogénesis, tal como miR-92 (incluyendo miR-92a-1, miR-92a-2 y miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (incluyendo miR-16-1 y miR-16-2), miR-374 (incluyendo miR-374a, miR-374b y miR-374c), miR-24 (incluyendo miR-24-1 y miR-24-2), miR-483, miR-34 (incluyendo miR-34a, miR-34b y miR-34c), miR-20 (incluyendo miR-20a y miR-20b), miR-15 (incluyendo miR-15a y miR-15b), o su precursor, como se desvela en el presente documento, permite una liberación local eficaz de dicho inhibidor en cantidades terapéuticamente eficaces y a tasas de liberación terapéuticamente eficaces.

En un primer aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de un microARN involucrado en la angiogénesis y la presentación de una actividad antiangiogénica, o su precursor, en el que dicho inhibidor es un oligonucleótido antisentido que es complementario a dicho miARN, o su precursor, en el que dicho inhibidor se microencapsula en microesferas poliméricas biodegradables y biocompatibles, en el que dichas microesferas están hechas de un copolímero seleccionado de entre poli-d,l-lactida (PLA) y poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA), combinándose dicho polímero opcionalmente con uno o varios de otros polímeros.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de un microARN seleccionado de la familia que comprende miR-92 (incluyendo miR-92a-1, miR-92a-2 y miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (incluyendo miR-16-1 y miR-16-2), miR-374 (incluyendo miR-374a, miR-374b y miR-374c), miR-24 (incluyendo miR-24-1 y miR-24-2), miR-483, miR-34 (incluyendo miR-34a, miR-34b y miR-34c), miR-20 (incluyendo miR-20a y miR-20b), miR-15 (incluyendo miR-15a y miR-15b), o su precursor, en el que dicho inhibidor es un oligonucleótido antisentido que es complementario a dicho miARN, o su precursor, en el que dicho inhibidor se microencapsula en microesferas poliméricas biodegradables y biocompatibles, en el que dichas microesferas están hechas de un copolímero seleccionado de entre poli-d,l-lactida (PLA) y poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA), combinándose dicho polímero opcionalmente con uno o varios de otros polímeros.

En otro aspecto adicional de la invención, la invención se refiere a una composición que comprende una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de miR-92a, o su precursor, en el que dicho inhibidor se microencapsula en microesferas poliméricas biodegradables y biocompatibles.

Por la expresión "microesferas", se debe entender partículas esféricas de tamaño desde 1 μm hasta algunos cientos de μm . La expresión "micropartículas" incluye tanto "microesferas" como "microcápsulas". En la presente memoria descriptiva se usa la expresión "microesferas", pero se debe entender que, cuando es posible la sustitución con una "microcápsula" y de interés según el experto en la técnica, es equivalente el uso de "microesferas" y "microcápsulas".

Por la expresión "encapsulado" o "microencapsulado" se debe entender encerrado o incorporado en partículas para la protección o para liberación modificada.

En otras palabras, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de un microARN involucrado en la angiogénesis, seleccionándose preferentemente dicho inhibidor de un microARN del grupo que comprende, o alternativamente que consiste en, miR-92 (incluyendo miR-92a-1, miR-92a-2 y miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (incluyendo miR-16-1 y miR-16-2), miR-374 (incluyendo miR-374a, miR-374b y miR-374c), miR-24 (incluyendo miR-24-1 y miR-24-2), miR-483, miR-34 (incluyendo miR-34a,

miR-34b y miR-34c), miR-20 (incluyendo miR-20a y miR-20b), miR-15 (incluyendo miR-15a y miR-15b), o su precursor, en el que dicho inhibidor es un oligonucleótido antisentido que es complementario a dicho miARN, o su precursor, microencapsulado en microesferas biodegradables y biocompatibles, en el que dichas microesferas están hechas de un copolímero seleccionado de entre poli-d,l-lactida (PLA) y poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA), combinándose dicho polímero opcionalmente con uno o varios de otros polímeros.

En otras palabras, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de miR-92a, o su precursor, en el que dicho inhibidor es un oligonucleótido antisentido que es complementario a dicho miARN, o su precursor, microencapsulado en microesferas biodegradables y biocompatibles, en el que dichas microesferas están hechas de un copolímero seleccionado de entre poli-d,l-lactida (PLA) y poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA), combinándose dicho polímero opcionalmente con uno o varios de otros polímeros.

"Composición farmacéutica" significa una mezcla de sustancias adecuadas para administración a un individuo que incluye un agente farmacéutico. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender un inhibidor de miARN y una disolución acuosa estéril.

En una realización de la composición de la invención, dicho miARN involucrado en la angiogénesis consiste en un miARN maduro.

En una realización de la composición de la invención, dicho microARN consiste en la forma madura de:

- a) miR-92a que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 21, 22 o 23 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 21, 22 o 23;
- b) miR-92b que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 24 o 25 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 24 o 25;
- c) miR-17 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 26 o 27 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 26 o 27;
- d) miR-503 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 28 o 29 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 28 o 29;
- e) miR-16 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 30, 31 o 32 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 30, 31 o 32;
- f) miR-374 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 33, 34, 35, 36, 37 o 38 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 33, 34, 35, 36, 37 o 38;
- g) miR-24 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 39, 40, 41 o 42 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 39, 40, 41 o 42;
- h) miR-483 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 43 o 44 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 43 o 44;
- i) miR-34 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 45, 46, 47, 48, 49 o 50 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 45, 46, 47, 48, 49 o 50;
- j) miR-20 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 51, 52, 53 o 54 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 51, 52, 53 o 54; y
- k) miR-15 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 55, 56, 57 o 58 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 55, 56, 57 o 58.

En otra realización de la composición de la invención, dicho miR-92a consiste en el miR-92a maduro que comprende la secuencia SEQ ID NO. 21 o una secuencia que tiene al menos 90 %, preferentemente 95 %, de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 21.

En otra realización de la composición de la invención, dicho miR-92a consiste en el miR-92a maduro que comprende la secuencia SEQ ID NO. 22 o una secuencia que tiene al menos 90 %, preferentemente 95 %, de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 22.

En otra realización de la composición de la invención, dicho miR-92a consiste en el miR-92a maduro que comprende la secuencia SEQ ID NO. 23 o una secuencia que tiene al menos 90 %, preferentemente 95 %, de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 23.

5 En el sentido de la presente invención, el "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de ácidos nucleicos significa el porcentaje de restos de nucleótidos idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenido después del alineamiento óptimo, siendo este porcentaje puramente estadístico y estando las diferencias entre las dos secuencias distribuidas al azar a lo largo de su longitud. La comparación de las dos secuencias de ácidos nucleicos se lleva a cabo tradicionalmente comparando las secuencias después de haberlas alineado óptimamente, siendo dicha comparación capaz de ser realizada por segmento o usando una "ventana de alineamiento". El alineamiento
10 óptimo de las secuencias para la comparación se puede llevar a cabo, además de la comparación a mano, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981), por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch (1970), por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) o por medio de software informático usando estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o por el software de comparación
15 BLAST NR o BLAST P).

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos se determina comparando las dos secuencias óptimamente alineadas en las que la secuencia de ácidos nucleicos a comparar puede tener adiciones o deleciones en comparación con la secuencia de referencia para el alineamiento óptimo entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones en las que el resto de nucleótido es idéntico entre las
20 dos secuencias, preferentemente entre las dos secuencias completas, dividiendo el número de posiciones idénticas entre el número total de posiciones en la ventana de alineamiento y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre las dos secuencias.

Como se prevé en el presente documento, las secuencias de nucleótidos que tienen al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una secuencia de referencia engloban aquellas que tienen al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y 99 % de identidad de nucleótidos con dicha secuencia de referencia.
25

En una realización de la composición de la invención, dicho miARN involucrado en la angiogénesis consiste en un precursor de microARN.

En una realización de la invención, dicho precursor de microARN involucrado en la angiogénesis consiste en:

- 30 a) mir-92a-1 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 1, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 1;
- b) mir-92a-2 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 2, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 2;
- c) mir-92b que comprende la secuencia SEQ ID NO. 3, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 3;
- 35 d) mir-17 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 4 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 4;
- e) mir-503 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 5 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 5;
- 40 f) mir-16-1 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 6, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 6; y
- g) mir-16-2 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 7, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 7;
- h) mir-374a que comprende la secuencia SEQ ID NO. 8, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 8;
- 45 i) mir-374b que comprende la secuencia SEQ ID NO. 9, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 9;
- j) mir-374c que comprende la secuencia SEQ ID NO. 10, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 10;
- 50 k) mir-24-1 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 11, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 11;
- l) mir-24-2 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 12, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 12;

- m) mir-483 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 13, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 13;
- n) mir-34a que comprende la secuencia SEQ ID NO. 14, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 14;
- 5 o) mir-34b que comprende la secuencia SEQ ID NO. 15, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 15;
- p) mir-34c que comprende la secuencia SEQ ID NO. 16, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 16;
- 10 q) mir-20a que comprende la secuencia SEQ ID NO. 17, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 17;
- r) mir-20b que comprende la secuencia SEQ ID NO. 18, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 18;
- s) mir-15a que comprende la secuencia SEQ ID NO. 19, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 19, y
- 15 t) mir-15b que comprende la secuencia SEQ ID NO. 20, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 20.

En términos generales, un inhibidor es una molécula que reprime o previene que otra molécula participe en una reacción.

20 Como se usa en el presente documento, el término "inhibidor de miR-X, o mir-X" se refiere a cualquier molécula o compuesto que disminuya o reduzca la expresión y/o actividad de miR-X, o mir-X, o al menos un precursor. Esta inhibición debe prevenir, como consecuencia, la inhibición de la neo-angiogénesis, es decir, promover la neoangiogénesis para prevenir la remodelación adversa de músculo cardíaco después del infarto.

25 En una realización de la invención, dicho inhibidor de un microARN dado involucrado en la angiogénesis es un oligonucleótido de 8-49 nucleótidos de longitud que tiene una secuencia dirigida a dicho microARN dado, siendo dicho microARN seleccionado preferentemente del grupo que comprende miR-92 (incluyendo miR-92a-1, miR-92a-2 y miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (incluyendo miR-16-1 y miR-16-2), miR-374 (incluyendo miR-374a, miR-374b y miR-374c), miR-24 (incluyendo miR-24-1 y miR-24-2), miR-483, miR-34 (incluyendo miR-34a, miR-34b y miR-34c), miR-20 (incluyendo miR-20a y miR-20b), 5 miR-15 (incluyendo miR-15a y miR-15b), o su precursor.

30 En otra realización, dicho inhibidor de miR-92a es un oligonucleótido de 8-49 nucleótidos de longitud que tiene una secuencia dirigida a dicho miR-92a.

La expresión "dirigido a" significa que tiene una secuencia de nucleótidos que permitirá la hibridación con un ácido nucleico diana para inducir un efecto deseado. En ciertas realizaciones, un efecto deseado es la reducción y/o la inhibición de un ácido nucleico diana.

35 "Hibridar" significa la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que ocurre mediante "complementariedad de nucleótidos", es decir, la capacidad de dos nucleótidos para emparejarse no covalentemente mediante enlace de hidrógeno.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos del inhibidor de miARN tienen 8 a 49 nucleótidos de longitud.

40 Un experto habitual en la materia apreciará que esto integra oligonucleótidos de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o 49 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo intermedio. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos según la invención tienen 10 a 20 nucleótidos de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que esto integra oligonucleótidos de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo intermedio.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido tiene una secuencia que es complementaria a un miARN o su precursor.

45 En una realización de la composición de la invención, dicho oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido que es al menos parcialmente complementario a la secuencia del miARN diana involucrado en la angiogénesis, siendo dicho miARN diana preferencialmente seleccionado de miR-92 (incluyendo miR-92a-1, miR-92a-2 y miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (incluyendo miR-16-1 y miR-16-2), miR-374 (incluyendo miR-374a, miR-374b) y miR-374c), miR-24 (incluyendo miR-24-1 y miR-24-2), miR-483, miR-34 (incluyendo miR-34a, miR-34b y miR-34c), miR-20 (incluyendo miR-20a y miR-20b), miR-15 (incluyendo miR-15a y miR-15b), o su precursor.

50

En otra realización de la composición de la invención, dicho oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido que es al menos parcialmente complementario a la secuencia de miR-92a.

La expresión "oligonucleótido antisentido" se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos específica (denominada una secuencia sentido) y capaz de hibridarse con la secuencia sentido.

"Complementariedad" significa la capacidad de apareamiento de nucleótidos entre un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico.

En ciertas realizaciones, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un microARN o su precursor, que significa que la secuencia del oligonucleótido antisentido es al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica al complemento de un microARN o su precursor, o que las dos secuencias se hibridan en condiciones de hibridación rigurosas. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido antisentido puede tener uno o más pares de bases desapareados con respecto a su microARN diana o secuencia precursora, y es capaz de hibridarse con su secuencia diana. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido tiene una secuencia que es completamente complementaria a un microARN o su precursor, que significa que la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido antisentido es 100 % idéntica al complemento de un microARN o su precursor.

En el contexto de la presente invención, "complementario" significa un oligonucleótido antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos que es al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 %, idéntica al complemento de la secuencia de nucleótidos de miR-92a, o su precursor, a lo largo de una región de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o 49 nucleótidos, o que las dos secuencias se hibridan en condiciones de hibridación rigurosas.

"Porcentaje de complementariedad" significa el número de nucleótidos complementarios en un ácido nucleico dividido entre la longitud del ácido nucleico. En ciertas realizaciones, el porcentaje de complementariedad de un oligonucleótido significa el número de nucleótidos que son complementarios al ácido nucleico diana, dividido entre la longitud del oligonucleótido.

En una realización, la secuencia de oligonucleótidos antisentido es "completamente complementaria" a la secuencia del microARN diana involucrado en la angiogénesis, preferencialmente seleccionado del grupo que comprende miR-92 (incluyendo miR-92a-1, miR-92a-2 y miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (incluyendo miR-16-1 y miR-16-2), miR-374 (incluyendo miR-374a, miR-374b y miR-374c), miR-24 (incluyendo miR-24-1 y miR-24-2), miR-483, miR-34 (incluyendo miR-34a, miR-34b y miR-34c), miR-20 (incluyendo miR-20a y miR-20b), miR-15 (incluyendo miR-15a y miR-15b), y más preferencialmente miR-92a, o sus precursores, que significa que cada nucleótido del oligonucleótido antisentido es capaz de aparearse con un nucleótido en cada posición correspondiente en el microARN diana o su precursor.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido según la invención tiene una secuencia que es parcialmente o completamente complementaria a la secuencia de:

a) miR-92a que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 21, 22 o 23 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 21, 22 o 23;

b) miR-92b que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 24 o 25 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 24 o 25;

c) miR-17 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 26 o 27 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 26 o 27;

d) miR-503 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 28 o 29 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 28 o 29; y

e) miR-16 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 30, 31 o 32 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 30, 31 o 32;

f) miR-374 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 33, 34, 35, 36, 37 o 38 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 33, 34, 35, 36, 37 o 38;

g) miR-24 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 39, 40, 41 o 42 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 39, 40, 41 o 42;

h) miR-483 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 43 o 44 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 43 o 44;

5 i) miR-34 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 45, 46, 47, 48, 49 o 50 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 45, 46, 47, 48, 49 o 50;

j) miR-20 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 51, 52, 53 o 54 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 51, 52, 53 o 54; y

10 k) miR-15 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 55, 56, 57 o 58 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 55, 56, 57 o 58.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido según la invención tiene una secuencia que es parcialmente o completamente complementaria a la secuencia de:

15 a) mir-92a-1 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 1, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 1;

b) mir-92a-2 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 2, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 2;

c) mir-92b que comprende la secuencia SEQ ID NO. 3, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 3;

20 d) mir-17 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 4 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 4;

e) mir-503 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 5 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 5;

25 f) mir-16-1 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 6, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 6; y

g) mir-16-2 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 7, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 7;

h) mir-374a que comprende la secuencia SEQ ID NO. 8, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 8;

30 i) mir-374b que comprende la secuencia SEQ ID NO. 9, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 9;

j) mir-374c que comprende la secuencia SEQ ID NO. 10, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 10;

35 k) mir-24-1 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 11, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 11;

l) mir-24-2 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 12, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 12;

m) mir-483 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 13, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 13;

40 n) mir-34a que comprende la secuencia SEQ ID NO. 14, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 14;

o) mir-34b que comprende la secuencia SEQ ID NO. 15, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 15;

45 p) mir-34c que comprende la secuencia SEQ ID NO. 16, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 16;

q) mir-20a que comprende la secuencia SEQ ID NO. 17, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 17;

r) mir-20b que comprende la secuencia SEQ ID NO. 18, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 18;

s) mir-15a que comprende la secuencia SEQ ID NO. 19, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 19, y

5 t) mir-15b que comprende la secuencia SEQ ID NO. 20, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 20.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido según la invención tiene una secuencia que es parcialmente complementaria a la secuencia de mir-92a-1 (SEQ ID NO: 1).

10 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido según la invención tiene una secuencia que es completamente complementaria a la secuencia de mir-92a-1 (SEQ ID NO: 1).

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido según la invención tiene una secuencia que es parcialmente complementario a la secuencia de mir-92a-2 (SEQ ID NO: 2).

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido antisentido según la invención tiene una secuencia que es completamente complementaria a la secuencia de mir-92a-2 (SEQ ID NO: 2).

15 En una realización, el oligonucleótido antisentido comprende un esqueleto modificado. Los ejemplos de dichos esqueletos se proporcionan por esqueletos de morfolino, esqueletos de carbamato, esqueletos de siloxano, esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona, esqueletos de formacetilo y tioformacetilo, esqueletos de metilformacetilo, esqueletos de riboacetilo, esqueletos que contienen alqueno, esqueletos de sulfamato, sulfonato y sulfonamida, esqueletos de metilnimino y metilhidrazino, y esqueletos de amida.

20 Los oligonucleótidos de morfolino tienen un esqueleto sin carga en el que el azúcar de desoxirribosa del ADN está sustituido por un anillo de seis miembros y el enlace fosfodiéster está sustituido por un enlace fosforodiamidato. Los oligonucleótidos de morfolino son resistentes a la degradación enzimática y parecen funcionar como agentes antisentido deteniendo la traducción o interfiriendo con el corte y empalme de pre-ARNm en vez de activando la RNasa H.

25 Se prefiere normalmente un esqueleto modificado para aumentar la resistencia a nucleasa. También se puede preferir un esqueleto modificado debido a su afinidad alterada por la secuencia diana en comparación con un esqueleto no modificado. Un esqueleto no modificado puede ser ARN o ADN.

30 Otro oligonucleótido antisentido adecuado comprende un ácido nucleico peptídico (PNA), que tiene un esqueleto de poliamida modificado. Las moléculas basadas en PNA son miméticos verdaderos de las moléculas de ADN en términos de reconocimiento de pares de bases. El esqueleto del PNA está compuesto por unidades de 7V-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces peptídicos, en el que las nucleobases se unen al esqueleto por enlaces metilencarbonilo.

35 Un esqueleto adecuado adicional comprende un análogo de nucleótidos de morfolino o equivalente, en el que el azúcar de ribosa o desoxirribosa se sustituye con un anillo de morfolino de 6 miembros. Un análogo de nucleótidos o equivalente más preferido comprende un oligómero de morfolino de fosforodiamidato (PMO), en el que el azúcar de ribosa o desoxirribosa se sustituye por un anillo de morfolino de 6 miembros, y el enlace fosfodiéster aniónico entre anillos de morfolino adyacentes se sustituye por un enlace fosforodiamidato no iónico.

40 En todavía una realización adicional, un oligonucleótido antisentido de la invención comprende una sustitución de uno de los oxígenos no de puente en el enlace fosfodiéster. Esta modificación desestabiliza ligeramente el apareamiento de bases, pero añade resistencia significativa a la degradación por nucleasas.

45 Un oligonucleótido antisentido adecuado adicional de la invención comprende uno o más restos de azúcar que están mono- o disustituidos en la posición 2', 3' y/o 5' tal como un -OH; -F; alquilo (Cl- ClO), alqueno, alquino, alcarilo, alilo, arilo o aralquilo inferior sustituido o sin sustituir, lineal o ramificado, que se puede interrumpir por uno o más heteroátomos; 0-, S- o N-alquilo; 0-, S- o N-alqueno; 0-, S- o N-alquino; 0-, S- o N-alilo; O-alquil-O-alquilo, -metoxi, -aminopropoxi; -aminoxi; metoxietoxi; - dimetilaminoxietoxi; y -dimetilaminoetoxietoxi.

El resto de azúcar puede ser una piranosa o su derivado, o una desoxipiranosa o su derivado, preferentemente una ribosa o su derivado, o una desoxirribosa o su derivado. Dichos restos de azúcar derivatizados preferidos comprenden ácido nucleico bloqueado.

50 Una LNA es un nucleótido de ARN modificado en el que el resto de ribosa del nucleótido de LNA se modifica con un puente adicional que conecta los carbonos 2' y 4'. Esto potencia el apilamiento de bases y la organización previa, y aumenta significativamente la estabilidad térmica. Este puente "bloquea" la ribosa en la conformación estructural 3'-endo, que se encuentra frecuentemente en la forma A de ADN o ARN. Los nucleótidos de LNA usados en la presente invención se pueden mezclar con bases de ADN o ARN en el oligonucleótido, siempre que se desee.

Según la invención, dicho oligonucleótido antisentido se selecciona del grupo que consiste en un ribonucleótido, un desoxirribonucleótido, un ARN pequeño, un antagomir, un LNA, un CDNA, un PNA, un oligonucleótido de morfolino o una combinación de los mismos.

En otra realización, el oligonucleótido antisentido puede consistir en un antagomir.

- 5 En una realización preferida de la composición de la invención, dicho oligonucleótido consiste en un antagomir.

Los antagomires son oligonucleótidos químicamente manipulados que se usan para silenciar microARN endógeno. Un antagomir es un ARN o ADN sintético pequeño que es perfectamente complementario a la diana de microARN específica con cualquier apareamiento erróneo en el sitio de escisión o algún tipo de modificación de base para inhibir la escisión. Normalmente, los antagomires tienen algún tipo de modificación para hacerlos más resistentes a la degradación y facilitar la internalización celular. No está claro cómo funciona la antagomirización (el proceso por el que un antagomir inhibe la actividad de microARN), pero se cree que inhibe irreversiblemente la unión de microARN. Los antagomires se usan para inhibir constitutivamente la actividad de microARN específicos.

- 10

En una realización de la invención, dicho antagomir comprende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleótidos contiguos complementarios a un microARN, o su precursor, teniendo dicho microARN una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 1 a 58.

- 15

En una realización de la invención, dicho antagomir comprende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleótidos contiguos complementarios a mir-92a de la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 1, 2 o 3.

- 20

En una realización de la invención, dicho antagomir comprende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleótidos contiguos complementarios a miR-92a de la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 21, 22 o 23.

En otra realización, dicho antagomir comprende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos 16 nucleótidos contiguos complementarios a los nucleótidos de la secuencia SEQ ID NO. 21.

En una realización de la invención, dicho antagomir posee un esqueleto de ADN.

- 25

En dicha realización de la composición de la invención, dicho antagomir comprende la secuencia SEQ ID NO. 59 y modificaciones que excluyen sustituciones de bases de la misma, y fragmentos que consisten en subsecuencias de SEQ ID NO: 59 de al menos 8 nucleótidos contiguos de la misma.

En otra realización de la invención, dicho antagomir posee un esqueleto de ARN.

- 30

En dicha realización de la composición de la invención, dicho antagomir comprende la secuencia SEQ ID NO. 60 y modificaciones que excluyen sustituciones de bases de la misma, y fragmentos que consisten en subsecuencias de SEQ ID NO: 60 de al menos 8 nucleótidos contiguos de la misma.

En una realización, el antagomir según la invención es un fragmento que consiste en una subsecuencia de SEQ ID NO: 59 o 60 de al menos 8 nucleótidos contiguos de la misma.

- 35

En una realización, el antagomir según la invención es un fragmento que consiste en una subsecuencia de SEQ ID NO: 59 o 60 de al menos 9 nucleótidos contiguos de la misma.

En una realización, el antagomir según la invención es un fragmento que consiste en una subsecuencia de SEQ ID NO: 59 o 60 de al menos 10 nucleótidos contiguos de la misma.

En una realización, el antagomir según la invención es un fragmento que consiste en una subsecuencia de SEQ ID NO: 59 o 60 de al menos 11 nucleótidos contiguos de la misma.

- 40

En una realización, el antagomir según la invención es un fragmento que consiste en una subsecuencia de SEQ ID NO: 59 o 60 de al menos 12 nucleótidos contiguos de la misma.

En una realización, el antagomir según la invención es un fragmento que consiste en una subsecuencia de SEQ ID NO: 59 o 60 de al menos 13 nucleótidos contiguos de la misma.

- 45

En una realización, el antagomir según la invención es un fragmento que consiste en una subsecuencia de SEQ ID NO: 59 o 60 de al menos 14 nucleótidos contiguos de la misma.

En una realización, el antagomir según la invención es un fragmento que consiste en una subsecuencia de SEQ ID NO: 59 o 60 de al menos 15 nucleótidos contiguos de la misma.

En otra realización, dicho antagomir de secuencia SEQ ID NO. 59 o 60 presenta al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 nucleótido(s) modificado(s) por enlace(s) fosfotioato entre nucleótidos adyacentes.

En otras realización de la invención, dicho antagomir puede incluir nucleótido modificado por 2'-O-metilo, grupo colesterol o cualquier modificación similar o equivalente.

5 Generalmente, si una formulación farmacéutica que contiene un ácido nucleico, un péptido y una proteína se administra por vía oral o por vía parenteral, se degrada por enzimas en el cuerpo, y la eficacia de la formulación farmacéutica desaparece rápidamente. Se han hecho diversos ensayos para superar el problema. Uno de los cuales es formular un inyectable de liberación sostenida larga.

10 En la práctica, se está realizando investigación sobre el uso de prótesis endovasculares como sistema para la administración selectiva de microARN. Sin embargo, la rápida endotelización de las prótesis endovasculares podría plantear un problema con respecto a la liberación sostenida de microARN, especialmente para procesos biológicos que requieren modulación génica prolongada. Además, se han desarrollado y usado liposomas y nanopartículas *in vivo*, pero no se ha evitado el paso al aparato circulatorio con el riesgo de efectos secundarios graves. Además, ningún estudio ha demostrado eficacia y seguridad después de la administración intracoronaria percutánea sin pinzamiento aórtico anterior.

Otro aspecto de la invención se basa en el uso de microesferas biodegradables y biocompatibles.

15 Según la descripción, se ha diseñado y fabricado un sistema de liberación apropiado para la liberación localizada de oligonucleótidos en la región cardíaca, basándose en la microencapsulación de dichos oligonucleótidos con polímeros biodegradables biocompatibles. La invención permite obtener microesferas sustancialmente cargadas con oligonucleótidos, que tienen alta eficiencia de encapsulación y ninguna modificación/degradación de moléculas. Según la invención, la pureza y calidad de la molécula, sin añadir ni un agente estabilizante ni una sustancia de retención, se conserva gracias a las condiciones de fabricación usadas, particularmente las características de la emulsión creada, la concentración de la disolución de polímero y la relación entre los volúmenes de fases involucrados en el proceso de microencapsulación. Además, las microesferas tienen una distribución apropiada del tamaño de partículas para permitir que sean retenidas en los microvasos del área infartada sin causar embolización arterial y sin ser destruidas por la acción fagocítica de los macrófagos.

20 Es un objeto de la presente invención proporcionar una microesfera de liberación sostenida, que encapsula establemente un ácido desoxirribonucleico de cadena corta o un ácido ribonucleico de cadena corta, y es capaz de inhibir, durante un largo periodo, la inhibición de la expresión de una proteína específica, especialmente una proteína cuya inhibición está relacionada con una enfermedad.

30 En términos generales, "biocompatible" significa compatible con las células vivas, tejidos, órganos o sistemas, y que no plantea riesgo de lesión, toxicidad o rechazo por el sistema inmunitario. Una microesfera biocompatible significa que la microesfera, y cualquier producto de degradación de la microesfera, no es tóxico para el receptor y tampoco presenta efectos perjudiciales o no deseados significativos sobre el cuerpo del receptor, tal como una reacción inmunológica en el sitio de inyección.

En términos generales, "biodegradable" significa capaz de ser descompuesto por la acción de agentes biológicos.

35 Una microesfera biodegradable, como se define en el presente documento, significa que la microesfera se degradará o erosionará *in vivo* para formar especies químicas más pequeñas. La degradación puede resultar, por ejemplo, por procesos enzimáticos, químicos y/o físicos.

40 Los polímeros biodegradables biocompatibles adecuados incluyen, por ejemplo, poli(lactidas), poli(glicolidas), poli(lactidas-co-glicolidas), poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), poli(ácidos lácticos-co-ácidos glicólicos), policaprolactona, policarbonatos, poliésteramidas, polianhídridos, poli(aminoácidos), poliortoésteres, poliacetilos, policianoacrilatos, poliéter-ésteres, poli(dioxanonas), poli(alquilatos de alquileo), copolímeros de polietilenglicol y poliortoéster, poliuretanos biodegradables, mezclas y sus copolímeros.

Se han descrito en el estado de la técnica varias técnicas para producir micropartículas.

45 El perfil de liberación de fármacos para una micropartícula depende de numerosos factores, que incluyen propiedades fisicoquímicas de los polímeros usados, interacciones entre polímero-fármaco-excipientes y/o morfología y composición de las micropartículas resultantes.

50 Con el fin de que las microesferas sean retenidas por los capilares miocárdicos, deben tener distribución de tamaños muy específica de manera que se minimice su destrucción mediante fagocitosis por macrófagos, por una parte, o la embolización de las arterias, por otra parte; la microencapsulación usando un polímero biocompatible biodegradable permite la liberación controlada del producto desde las horas iniciales durante hasta 2-3 semanas, el periodo principal durante el cual ocurre la remodelación ventricular post-IAM.

55 En el contexto de la presente invención, como se prefiere la vía intracoronaria, el tamaño promedio de estas microesferas es condescendiente con el tamaño de los capilares miocárdicos; éste varía entre 5 y 20, preferencialmente entre 5 y 15 micrómetros, para ser retenidas en la región cardíaca, y sin partículas superiores a 25 micrómetros para prevenir la embolización arterial.

- En una realización de la invención, dichas microesferas presentan un diámetro que no supera 25 μm .
- En una realización, 50 a 100 % de las microesferas están comprendidas en el intervalo de 5 a 25 μm y ninguna partícula superior a 25 μm
- 5 En una realización preferida, 60 a 100 % de las microesferas están comprendidas en el intervalo de 5 a 25 μm y ninguna partícula superior a 25 μm .
- En otra realización preferida, 70 a 100 % de las microesferas están comprendidas en el intervalo de 5 a 25 μm y ninguna partícula superior a 25 μm .
- En una realización más preferida, 80 a 100 % de las microesferas están comprendidas en el intervalo de 5 a 25 μm y ninguna partícula superior a 25 μm .
- 10 Según la invención, el diámetro promedio de las microesferas está en el intervalo de 5 a 20 μm .
- Según la invención, el diámetro promedio de las microesferas está en el intervalo de 5 a 15 μm .
- En una realización alternativa, dichas microesferas presentan un diámetro promedio de 8 a 11 μm .
- Las microesferas según la invención cargan una alta cantidad de dicho inhibidor de microARN en un polímero biodegradable y biocompatible para la liberación sostenida del fármaco en el área infartada.
- 15 La carga del inhibidor de microARN es desde aproximadamente 1 hasta 20 % (p/p), preferentemente desde 1 hasta 15 % (p/p), y más preferentemente 1 hasta 10 y todavía más preferentemente desde 5 hasta 10 %. Se conserva la integridad del fármaco.
- En una realización, las microesferas según la invención incorporan desde 1 % hasta 15 % p/p de inhibidor.
- En otra realización, las microesferas según la invención incorporan desde 5 % hasta 15 % p/p de inhibidor.
- 20 Aún en otra realización, las microesferas según la invención incorporan desde 1 % hasta 10 %, preferentemente desde 5 % hasta 10 % p/p de inhibidor.
- Otra característica de la invención se refiere a la naturaleza del polímero usado para la generación de las microesferas.
- 25 En una realización de la invención, dichas microesferas están hechas de un polímero que consiste en poli-d,l-lactida (PLA). En una realización, dichas microesferas están hechas de PLA como el único polímero. En una realización, dichas microesferas están hechas de PLA que se combina con uno o varios de otros polímeros biocompatibles.
- En otra realización de la invención, dichas microesferas están hechas de un copolímero que consiste en poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA). En una realización, dichas microesferas están hechas de PLGA como el único polímero.
- 30 En una realización, dichas microesferas están hechas de PLGA que se combina con uno o varios de otros polímeros biocompatibles.
- Todavía en otra realización de la invención, dichas microesferas están hechas de una combinación de polímeros que consiste en poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA) y poli-d,l-lactida (PLA).
- Por la expresión "mezcla", se debe entender que una mezcla de dos o más polímeros se realiza antes de la disolución de dicha mezcla en el mismo disolvente orgánico.
- 35 El experto en la técnica entenderá fácilmente que, al contrario del copolímero de PLGA, la relación de lactida:glicolida en el polímero de PLA comprende entre 100:0 de relación molar.
- Con respecto al copolímero de PLGA, la relación de lactida:glicolida en el polímero de PLGA comprende entre 50:50 y 95:5 de relación molar.
- 40 En una realización preferida, la relación de lactida:glicolida en el copolímero de PLGA comprende entre 50:50 y 90:10 de relación molar, y preferencialmente entre 50:50 y 80:20 de relación molar.
- En una realización de la invención, la viscosidad inherente del polímero comprende entre 0,1 y 0,7 dl/g.
- En una realización preferida, la viscosidad inherente del polímero comprende entre 0,15 y 0,7 dl/g, preferencialmente desde 0,15 hasta 0,5 dl/g.
- 45 Este aspecto es de interés en el sentido de que la viscosidad inherente se relaciona con el peso molecular del polímero y, por tanto, influye en la tasa de liberación del inhibidor de las poliméricas microesferas.

Por consiguiente, también es un objeto de la presente invención proporcionar un método de producción de un inhibidor microencapsulado de miR-92a que no incluye ningún adyuvante y que consistía en una única población de partículas en términos de composición polimérica.

5 Así, otro aspecto de la invención es un método de microencapsulación de un inhibidor de microARN en microesferas poliméricas, que comprende: (a) disolver el inhibidor de microARN en agua purificada, sin ningún estabilizador (b) disolver el polímero en un disolvente orgánico; (c) añadir (a) a (b) para producir una primera emulsión; (d) añadir la emulsión de la etapa (c) a una disolución acuosa que contiene un tensioactivo y un agente osmótico para producir una segunda emulsión; (e) endurecer y recoger las microesferas resultantes de la etapa (d); y (f) secar.

10 Más particularmente, la invención también se refiere a un método de producción de una composición como se ha descrito anteriormente, caracterizada por que comprende las siguientes etapas:

a) disolver el inhibidor de miARN en agua purificada, sin ningún estabilizador;

b) disolver polímero en un disolvente orgánico;

c) añadir (a) a (b) para producir una primera emulsión;

15 d) añadir la emulsión de la etapa (c) a una disolución acuosa que contiene un tensioactivo y un agente osmótico para producir una segunda emulsión; y

e) endurecer y recoger las microesferas resultantes de la etapa (d); y

f) secar las microesferas obtenidas.

Otro aspecto de la invención consiste en el uso de la composición según la invención en el tratamiento del infarto de miocardio.

20 En otras palabras, la invención se refiere a una composición que comprende una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de microARN, o su precursor, en el que dicho inhibidor se microencapsula en microesferas poliméricas biodegradables y biocompatibles para su uso en el tratamiento de infarto de miocardio.

En una realización preferida, dicho infarto de miocardio consiste en el infarto agudo de miocardio.

25 Aún otro aspecto de la invención se refiere a un método de inversión o prevención de la remodelación ventricular en un sujeto en necesidad de la misma que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una composición como se ha descrito anteriormente.

30 En otras palabras, la descripción se refiere a una composición que comprende una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de microARN, o su precursor, en el que dicho inhibidor se microencapsula en microesferas poliméricas biodegradables y biocompatibles para su uso en un método de inversión o prevención de la remodelación ventricular en un sujeto en necesidad de la misma.

Como ya se ha mencionado, la composición descrita en el presente documento es adecuada para una administración por vía intracoronaria.

35 Para administración por vía intracoronaria, las microesferas se deben suspender en un vehículo apropiado, ya sea una solución salina (PBS) con o sin un tensioactivo o en otro vehículo apropiado para administración intravenosa. Los dispersantes adecuados incluyen, por ejemplo, tensioactivos tales como polisorbato 80, polisorbato 20, aceite de ricino hidrogenado polioxietileno 60, carboximetilcelulosa, o polisacáridos tales como alginato de sodio; también es posible añadir un agente isotonzante tal como cloruro sódico, manitol, sorbitol o glucosa, por ejemplo. Dado el tamaño de las arterias coronarias, la concentración de microesferas en el medio de administración se ajusta con el fin de limitar la alteración de la circulación sanguínea y prevenir el riesgo de embolización arterial. Esta
40 concentración puede variar entre 0,05 % y 1 %, preferentemente entre 0,1 % y 0,5 %. La administración puede ser por una única inyección o inyecciones repetidas, seguido opcionalmente por una inyección de solución salina. La administración se podría llevar a cabo después de la angioplastia coronaria percutánea, sin limitación, usando el mismo catéter.

45 El método de la invención se caracteriza por que dicha administración consiste en una administración por vía intracoronaria.

Este aspecto es de particular interés ya que trata varias limitaciones presupuestas de la administración intravenosa directa de compuestos tales como oligonucleótido como antagomir. Entre otra limitación presupuesta, se puede mencionar i) bioseguridad de bajo nivel debido a la ubicuidad y baja especificidad por órgano de miARN, ii) alta dosis e inyecciones repetidas para el inhibidor de microARN para producir su efecto, y iii) alto coste teórico de la dosis intravenosa calculada.

Sorprendentemente, como será evidente después de la lectura de los siguientes ejemplos, todas estas cuestiones son tratadas por la invención.

Más particularmente, se demuestra que:

- 5 a) es posible administrar selectivamente el antagomir encapsulado en la arteria que suministra al tejido enfermo (véase el Ejemplo 5);
- b) las microesferas son retenidas en la coronaria (véase el Ejemplo 6);
- 10 c) la administración intrarterial de microesferas se usa para la embolización tumoral, que permite la interrupción permanente de la circulación sanguínea y prevención de la progresión tumoral, opcionalmente en combinación con sustancias activas de liberación. Teniendo en consideración estos elementos, se consideró la existencia de riesgo de embolización. Por este motivo, se diseñaron estudios con el objetivo de determinar que las microesferas no causan daño al músculo cardíaco ni producen ninguna alteración significativa en el caudal coronario (véase el Ejemplo 7);
- 15 d) buena estabilidad del inhibidor de microARN en el vehículo y de liberación sostenida de dicho inhibidor de las microesferas; esto se demuestra por su efecto biológico mientras que se inhiben los microARN durante hasta 10 días después desde que se administran (Ejemplo 8);
- e) la administración de microesferas con el inhibidor de miARN promueve la recuperación contráctil del tejido dañado y previene la aparición de remodelación post-infarto adversa (véase el Ejemplo 9);
- 20 f) con la administración localizada de microesferas, la dosis de inhibidor se podrían reducir a una única inyección, que supondría una reducción significativa de los posibles efectos secundarios y una clara reducción en el coste.

La disponibilidad de un vehículo/sistema apropiado para la administración controlada, administración y liberación de inhibidores de microARN según la invención tiene las siguientes ventajas:

- Bioseguridad potenciada, puesto que se limita la biodistribución del fármaco por tejido y órganos que no son la diana del tratamiento
- 25 - Evita inyecciones intravenosas repetidas i) reduce los ingresos hospitalarios y visitas ambulatorias al hospital, mejorando la calidad de la asistencia al paciente, ii) evita la necesidad de pinchados prolongados para la administración de fármacos, así como los posibles riesgos resultantes de esto y iii) minimiza los riesgos inherentes en la administración intravenosa de productos (infecciones, reacciones localizadas...)
- La reducción de dosis permite la reducción en los efectos adversos dependientes de la dosis relacionada
- 30 - La reducción de costes debido a una reducción en la dosis requerida así como el personal y equipo requerido para las inyecciones repetidas

En otra realización, la invención se refiere a una población de microesferas biodegradables y biocompatibles para su uso en el tratamiento o la prevención de la remodelación ventricular después de infarto de miocardio, en el que dichas microesferas:

- 35 - tienen un diámetro promedio comprendido entre 5 y 15 μm ;
- están hechas de poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA); poli-d,l-lactida (PLA) o su mezcla;
- incorporan desde 1 % hasta 10 % p/p de un agente terapéutico capaz de prevenir la remodelación ventricular

40 en la que dicho agente terapéutico consiste en un inhibidor de un microARN involucrado en la angiogénesis, preferencialmente un microARN seleccionado del grupo que consiste en miR-92 (incluyendo miR-92a-1, miR-92a-2 y miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (incluyendo miR-16-1 y miR-16-2), miR-374 (incluyendo miR-374a, miR-374b y miR-374c), miR-24 (incluyendo miR-24-1 y miR-24-2), miR-483, miR-34 (incluyendo miR-34a, miR-34b y miR-34c), miR-20 (incluyendo miR-20a y miR-20b), miR-15 (incluyendo miR-15a y miR-15b) y más preferencialmente miR-92a, o su precursor, en el que dicho inhibidor de microARN es preferencialmente un antagomir.

45 La invención también se refiere a un kit que comprende al menos i) una composición y/o microesferas según la invención y ii) una jeringa o vial o ampolla en el que se dispone la composición.

En una realización, el kit de la invención comprende además un disolvente dispuesto en un recipiente de disolvente. El recipiente de disolvente puede ser un vial, una ampolla o una jeringa precargada.

Las microesferas y el disolvente se pueden disponer en una jeringa precargada de compartimento doble.

En una realización, el kit de la invención puede comprender las microesferas en un vial y el disolvente en un vial separado.

En una realización, el kit de la invención puede comprender las microesferas en un vial y el disolvente en una ampolla separada.

- 5 En una realización, el kit de la invención puede comprender las microesferas en un vial y el disolvente en una jeringa precargada.

En una realización, el kit de la invención puede comprender las microesferas en una jeringa precargada y el disolvente en un vial separado.

- 10 En una realización, el kit de la invención puede comprender las microesferas en una jeringa precargada y el disolvente en una ampolla separada.

En una realización, el kit de la invención puede comprender las microesferas y el disolvente por separado en una jeringa de compartimento doble.

La invención se entenderá mejor con respecto a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de microesferas cargadas con antagomir-92a

- 15 Se prepararon microesferas por el método de emulsión w/o/w/evaporación de disolvente usando un copolímero de PLGA 50:50, viscosidad intrínseca de aproximadamente 0,2 dl/g, que contenía grupos terminales carboxilo libres. Se añadieron 3 ml de cloruro de metileno a 0,6 g de PLGA. Se añadieron 0,3 ml de una disolución concentrada de antagomir-92a (I-Ssc-miR-92a; masa molecular: 5366 g/mol (también denominada Da); secuencia: CCGGACAAGTGCAAT; bases de ADN: 9; bases de LNA: 7; fabricante: IDT (Exiqon)) (222 mg/ml) en agua
20 purificada a la disolución orgánica de PLGA y se emulsionó por sonicación durante 20 s. Esta emulsión primaria se añadió a una fase externa que consistía en una disolución acuosa de 1 % (p/v) de poli(alcohol vinílico) y 1 % (p/v) de cloruro sódico y se homogeneizó durante 60 s a aproximadamente 10300 rpm. La segunda emulsión (w/o/w) obtenida se añadió a un volumen de agua purificada y se dejó que el cloruro de metileno se evaporara agitando. Se recogieron por centrifugación las microesferas obtenidas, se lavaron dos veces con agua purificada, y entonces se
25 liofilizaron. El diámetro promedio de las microesferas fue 9 μm , (82 % entre 5-25 μm y 0 % superior a 25 μm), mientras que la eficiencia de encapsulación fue 74 %.

Una imagen de las microesferas obtenidas se representa en la Figura 1.

La Figura 2 ilustra la distribución del tamaño de microesferas.

Ejemplo 2: Preparación de microesferas cargadas con ARN

- 30 Se prepararon microesferas por el método de emulsión w/o/w/evaporación de disolvente usando un copolímero de PLGA 50:50, viscosidad intrínseca de aproximadamente 0,2 dl/g, que contenía grupos terminales carboxilo libres. Se añadieron 3 ml de cloruro de metileno a 0,6 g de PLGA. Se añadieron 0,3 ml de una disolución concentrada de ARN (222 mg/ml) (ARN Sigma 5000-10000 Da) en agua purificada libre de RNasa a la disolución orgánica de PLGA y se emulsionaron por sonicación durante 20 s. Esta emulsión primaria se añadió a una fase externa que consistía en una
35 disolución acuosa libre de RNasa de 1 % (p/v) de poli(alcohol vinílico) y 5 % (p/v) de manitol y se homogeneizó durante 60 s a aproximadamente 10300 rpm. La segunda emulsión (w/o/w) obtenida se añadió a un volumen de agua purificada libre de RNasa y se dejó que el cloruro de metileno se evaporara agitando. Se recogieron por centrifugación las microesferas obtenidas, se lavaron dos veces con agua purificada libre de RNasa, y entonces se liofilizaron. El diámetro promedio de las microesferas fue 10 μm (86 % entre 5-25 μm y 0 % superior a 25 μm),
40 mientras que la eficiencia de encapsulación fue 73 %.

Ejemplo 3: Preparación de microesferas de placebo

- Se prepararon microesferas por el método de emulsión w/o/w/evaporación de disolvente usando un copolímero de PLGA 50:50, viscosidad intrínseca de aproximadamente 0,2 dl/g, que contenía grupos terminales carboxilo libres. se añadieron 3 ml de cloruro de metileno a 0,6 g de PLGA. Se añadieron 0,3 ml de agua purificada a la disolución
45 orgánica de PLGA y se emulsionó por sonicación durante 20 s. Esta emulsión primaria se añadió a una fase externa que consistía en una disolución acuosa de 1 % (p/v) de poli(alcohol vinílico) y 1 % (p/v) de cloruro sódico y se homogeneizó durante 60 s a aproximadamente 10300 rpm. La segunda emulsión (w/o/w) obtenida se añadió a un volumen de agua purificada y se dejó que el cloruro de metileno se evaporara agitando. Se recogieron por centrifugación las microesferas obtenidas, se lavaron dos veces con agua purificada, y entonces se liofilizaron. El
50 diámetro promedio de las microesferas fue 7 μm , (84 % entre 5-25 μm y 0 % superior a 25 μm).

Ejemplo 4: Preparación de microesferas cargadas con albúmina-isotiocianato de fluoresceína

Se prepararon microesferas por el método de emulsión w/o/w/evaporación de disolvente usando un copolímero de PLGA 50:50, viscosidad intrínseca de aproximadamente 0,2 dl/g, que contenía grupos terminales carboxilo libres. Se

añadió 1 ml de cloruro de metileno a 0,2 g de PLGA. Se añadieron 0,1 ml de una disolución acuosa de albúmina-isotiocianato de fluoresceína (20 mg/ml) a la disolución orgánica de PLGA y se emulsionó por sonicación durante 15 s. Esta emulsión primaria se añadió a una fase externa que consistía en una disolución acuosa de 1 % (p/v) de poli(alcohol vinílico) y 1 % (p/v) y se homogeneizó durante 60 s a aproximadamente 10300 rpm. La segunda emulsión (w/o/w) obtenida se añadió a un volumen de agua purificada y se dejó que el cloruro de metileno se evaporara agitando. Se recogieron por centrifugación las microesferas obtenidas, se lavaron dos veces con agua purificada, y entonces se liofilizaron. El diámetro promedio de las microesferas fue 9 µm, (91 % entre 5-25 µm y 0 % superior a 25 µm).

Ejemplo 5: Estudio de administración selectiva en la arteria que suministra el tejido diana

Después de provocar un IAM en un cerdo Large White, se administraron por vía intracoronaria 30 mg de microesferas que contenían albúmina fluorescente, preparadas como se indica en el Ejemplo 4, por medio de un globo coaxial de 2,5/12 situado en la arteria responsable del IAM, que suministra el área infartada. Las microesferas se suspendieron *in situ* en 10 ml de solución salina normal que contenía Tween-80; la administración se realizó en 2 inyecciones consecutivas de 5 ml, cada una seguida por 5 ml de solución salina normal. Los experimentos mostraron que antagomir encapsulado puede ser selectivamente administrado en la arteria que suministra el tejido enfermo.

Ejemplo 6: Estudio de retención de las microesferas en los capilares del tejido enfermo sin permitir el flujo de salida en la circulación sanguínea

En un modelo de cerdo, se realizaron 4 experimentos administrando por vía intracoronaria a través de un globo coaxial situado en la rama descendente anterior interna 2 inyecciones con 5 ml cada una de microesferas fluorescentes preparadas según el Ejemplo 4. Se sacrificaron los 4 animales y se obtuvieron muestras miocárdicas del tejido que une la rama descendente anterior y el tejido de control irrigado por otras arterias coronarias. Las muestras se observaron a través de un microscopio óptico de fluorescencia y se demostró la presencia de microesferas retenidas en los capilares del músculo cardíaco dañado, así como su ausencia en el tejido de control.

Para descartar biodistribución sistémica, en dos de los animales previos, además del tejido miocárdico isquémico y de control, se obtuvieron 5 muestras por duplicado de pulmón, bazo e hígado y se visualizaron por microscopía óptica con luz B. La fluorescencia se detectó exclusivamente en la pared miocárdica anterior. Este análisis reveló que las microesferas son retenidas en el corazón, evitando la liberación sistémica de antagomir92a (reducción de efectos secundarios).

Ejemplo 7: Estudio de retención de microesferas en los capilares de tejido enfermo sin dañar el propio tejido diana

Se realizaron experimentos para investigar la posible toxicidad local al corazón y el intervalo de seguridad terapéutica de la dosis. Para detectar el daño isquémico local al músculo cardíaco, se emplearon 2 pares de cristales piezoeléctricos, que son altamente sensibles en su capacidad para detectar isquemia. Cuando el tejido del músculo cardíaco se afecta por isquemia, el tejido restante se vuelve discinético y se inflama; esto, junto con la tensión arterial producida por el tejido sano contiguo restante, causa que los microcristales se separen y se alejen el uno del otro. En dos cerdos después de realizar una toracotomía y una pericardiectomía, se insertaron dos pares de microcristales, un par de control en la región lateral y un par en la región anterior suministrada por la rama descendente anterior, a través de los cuales se administraron las microesferas. Para cada par de cristales medios, se midió la distancia entre ellos en dos puntos durante el ciclo cardíaco: en la diástole final (EDL) y la sístole final (ESL). La relación entre EDL y ESL se expresa por el parámetro SS (acortamiento sistólico: $(EDL - ESL) / EDL$). Cuando la contracción ventricular izquierda se disipa completamente $EDL = ESL$ y $SS = 0$. Los valores normales varían entre $0,2 \pm 0,1$. Como se muestra en la ilustración adjunta, se indujeron oscilaciones mínimas y transitorias después de cada inyección que duran algunos segundos con la dosis del estudio, correspondiente a la primera y segunda inyecciones. Además y sorprendentemente, no se observaron efectos secundarios locales con inyecciones intracoronarias repetidas de microesferas fluorescentes preparadas según el Ejemplo 4 alcanzando 14 veces la dosis del estudio. No se asoció máxima dosis limitante a daño isquémico irreversible, repercusión hemodinámica o arritmias.

Además, para detectar cambios en el flujo coronario, se puso un sensor de flujo en la LAD media que medía el flujo coronario. No se observaron cambios significativos en el flujo coronario después de las inyecciones intracoronarias.

Los resultados se ilustran por la Figura 3 en la que se inyectaron 120 mg de microesferas y por la Figura 4 en la que se inyectaron 240 mg de microesferas.

Ejemplo 8: Estudio del efecto molecular de una única inyección intracoronaria de microesferas con una dosis pequeña de antagomir

Con el fin de demostrar que dosis pequeñas de antagomir microencapsulado podrían producir una respuesta molecular, se midió la expresión de miR-92a *in vivo*, en tejido isquémico y de control, después de la administración intracoronaria de antagomir-92a encapsulado. En 3 cerdos, se administraron 60 mg de microesferas que contenían antagomir-92a preparado según el Ejemplo 1 (0,1 mg/kg) en LAD. Los animales se sacrificaron uno, tres y 10 días después del tratamiento y se cuantificó la expresión de miR-92a y microARN endógeno como controles (miR-123,

203 y 126) en 2 muestras infartadas por duplicado y de control por aislamiento de ARN total y RT-PCR cuantitativa en tiempo real usando cebadores específicos (véase la Figura 5).

5 En tejido infartado, la expresión de miR-92a produjo la regulación por disminución de 8 veces en comparación con el tejido de control, mientras que la expresión de miR endógenos no se afectó por el tratamiento. La inhibición empezó a estar presente ya desde el 1 día y todavía estuvo presente en el día 10, con niveles de expresión 5 veces más bajos que en el área de control.

No se detectó regulación significativa en miR endógenos. Estos resultados revelan que el vehículo/sistema proporciona condiciones adecuadas para permitir la liberación controlada y la liberación de antagomir-92a, produciendo así una inhibición sostenida de microARN-92a con una única administración intracoronaria.

10 Estos resultados, representados en la Figura 6, también confirman que el antagomir no se degrada durante el proceso de fabricación de microesferas.

Ejemplo 9: Estudio del efecto biológico de una única inyección intracoronaria de microesferas que contienen dosis bajas de antagomir

15 Con el fin de demostrar si el efecto molecular de antagomir-92a transportado por microesferas va acompañado por un efecto biológico, se realizó un estudio preclínico con 26 minicerdos adultos. El fin de este estudio era investigar si la inhibición de miR-92a por administración intracoronaria selectiva de antagomir-92a conducía o no a potenciar la angiogénesis en el área infartada, y así se prevenía la aparición de la remodelación ventricular.

Se administraron 3 formulaciones:

- Solución salina (formulación de control)
- 20 - Microesferas de placebo preparadas según el Ejemplo 3
- Microesferas de antagomir-92a preparadas según el Ejemplo 1, a una dosis de antagomir de 3 mg/minicerdo.

25 4 semanas después del tratamiento, se detectó mayor densidad vascular significativa en el área necrótica en los animales que recibieron antagomir-92a encapsulado en comparación con los controles, confirmando así la actividad proangiogénica de antagomir-92a observado en el estudio previo ($161,57 \pm 58,71$ frente a $68,49 \pm 23,56$ en el grupo de placebo frente a $73,91 \pm 24,97$ en el grupo de solución salina, $p=0,001$) ii) la densidad vascular (véase Figura 7).

30 La microvascularidad aumentó dentro de tanto la zona de infarto como el borde peri-infarto. Se demostró coherentemente un índice de resistencia microvascular más bajo en los animales tratados ($200,67 \pm 104,46$ frente a $511,73 \pm 202,1$ en controles, $p=0,007$) y se correlacionó significativamente con la densidad vascular (R^2 0,41, $p=0,02$) (véase la Figura 8).

35 La resistencia microcirculatoria inicial (RM inicial) y la resistencia microcirculatoria verdadera (RMV (hip)) fueron significativamente más bajas en el grupo tratado en comparación con los controles ($7,47 \pm 1,33$ frente a $19,62 \pm 2,98$, $p=0,005$ y $5,0 \pm 1,15$ frente a $14,49 \pm 2,4$, $p= 0,006$ respectivamente). La resistencia microcirculatoria inicial y verdadera se correlacionaron significativamente con la densidad vascular (R^2 0,35, $p=0,033$ y R^2 0,31, $p=0,047$, respectivamente (véase Figura 9).

Estos datos indican que antagomir-92a encapsulado induce una angiogénesis sostenida *in vivo*.

40 Habiendo encontrado vasos en crecimiento, por lo tanto, se investigaron adicionalmente sus posibles beneficios en el proceso de curación que ocurre después de un IAM. Para determinar los efectos de antagomir-92a encapsulado sobre la remodelación ventricular, se compararon parámetros morfológicos y estructurales por imagen por resonancia magnética *ex vivo* (CMR) y parámetros funcionales analizados por ecocardiografía intravascular (EIV), en los grupos tratados y no tratados. Estuvo presente un porcentaje más significativo de animales con discinesia anterior y septoapical en EIV en controles ($p=0,03$) (véase en particular la Figura 10), con adelgazamiento también significativamente mayor de la pared ventricular lesionada y cambios de morfometría de remodelación adversos en el ventrículo izquierdo en CMR *ex vivo* en comparación con los animales tratados (Tabla 3).

45 Más particularmente, la Figura 10 ilustra los resultados del análisis de la disfunción del movimiento de la pared regional por ecocardiografía intravascular (EIV). Se realizó EIV usando una máquina de obtención de imágenes por ultrasonidos Vivid Q (GE Healthcare, Belford, R.U.) y un catéter de ultrasonidos AcuNav 10F (Siemens) colocado en el vértice del ventrículo derecho.

50 Los resultados del estudio muestran que la administración de microesferas de antagomir-92a está asociada con una reducción estadísticamente significativa en la remodelación adversa tras el infarto agudo de miocardio.

Tabla 3: Parámetros de remodelación ventricular izquierda en CMR

	Solución salina (N=6)	Placebo ME (N=5)	Antagomir-92a ME (N=6)	P
Número de secciones de CMR infartadas	4,8 ± 0,3	4,8 ± 0,4	5,3 ± 0,2	0,38
T _{pared infartada máxima} , mm	6,07 ± 0,9	5,61 ± 0,5	9,01 ± 0,6	0,006
T _{pared posterior normal} , mm	13,23 ± 0,5	13,52 ± 1,8	11,82 ± 0,7	0,49
Porcentaje de adelgazamiento mínimo, %	54,79 ± 4,9	56,74 ± 4,1	22,71 ± 5,5	0.000
T _{pared infartada mínima} , mm	3,17 ± 0,4	4,02 ± 0,9	4,35 ± 0,5	0,33
Porcentaje de adelgazamiento máximo, %	76,40 ± 2,18	69,86 ± 4,72	62,54 ± 4,19	0,05
Longitud del adelgazamiento de la pared, mm	32,2 ± 1,8	31,7 ± 4	20,5 ± 3,6	0,03
D _R /D _N	1,93 ± 0,2	2,02 ± 0,2	1,29 ± 0,1	0,03
D _N , mm	14,88 ± 0,68	13,78 ± 1,59	17,5 ± 1,37	0,12
% de remodelación adversa (n)	83,3 (5)	80 (4)	16,7 (1)	0,03

Antagomir-92a encapsulado previene la remodelación ventricular izquierda adversa 1 mes después del infarto agudo de miocardio. Se determinaron los diferentes parámetros de la remodelación calculados en todas las secciones infartadas de CMR *ex vivo* en cada minicerdo. Se muestran la sección L2 representativa (siendo L1 el vértice) de cuatro minicerdos. T_{pared infartada máxima} = espesor medio máximo de la pared infartada calculado como \sum del espesor máximo de la pared de infarto en cada sección dividido entre el número de secciones afectadas; T_{pared posterior normal} = espesor medio de la pared posterior normal medido justo al lado de la inserción del músculo papilar posterior calculado como \sum del espesor de la pared posterior en cada sección afectada dividido entre el número de secciones afectadas; porcentaje medio del adelgazamiento mínimo calculado como $[100 - (T_{\text{pared infartada máxima}} / T_{\text{pared posterior normal}} \times 100)]$; T_{pared infartada mínima} = espesor medio mínimo de la pared infartada calculado como \sum del espesor mínimo de la pared del infarto en cada sección afectada dividida entre el número de secciones afectadas; el porcentaje medio del adelgazamiento máximo calculado como $[100 - (T_{\text{pared infartada mínima}} / T_{\text{pared posterior normal}} \times 100)]$; D_R: diámetro máximo medio entre la pared infartada y la pared normal contralateral calculado como \sum del diámetro máximo entre la pared infartada en cada sección infartada dividida entre el número de secciones afectadas; D_N: diámetro máximo medio entre paredes normales, que forman un ángulo recto con D_R y dibujado más cerca del centro de la cavidad ventricular, calculado como \sum del diámetro máximo entre paredes normales en cada sección infartada dividido entre el número de secciones afectadas; D_R/D_N: índice medio de esfericidad calculado como \sum de D_R/D_N de cada sección infartada dividido entre el número de rebanadas afectadas. Los datos de la tabla se expresan como la media ± e.e.m.

Los resultados de un CMR representativo muestran que:

A: RMN e EIV cardíaco del minicerdo 14 (muerte inmediatamente después de la inducción de IAM): Debido a la aparición de muerte inmediatamente tras el IAM, no hubo tiempo suficiente para desencadenar el proceso de remodelación. Esto es por lo que se observó que un ventrículo izquierdo concéntrico tenía dimensiones similares en todos los segmentos.

B: RMN e EIV cardíaco del minicerdo 20 hasta 30 días post-IAM: Evidencia de remodelación ventricular adversa: Un mes después del IAM, se observó demacración extrema de las secciones anterior y septal en CMR, así como una formación de aneurisma con discinesia en el EIV que es típico de la remodelación adversa post-IAM.

C: RMN e EIV cardíaco del minicerdo 22 hasta 30 días post-IAM: Sin remodelación ventricular: Un mes después del IAM, se observó una ligera reducción de la región parietal en las áreas anterior y septal sin formación de aneurisma y sin discinesia en la EIV. Esto es un caso típico de reacciones de reparación favorables después de IAM.

Ejemplo 10: Estudio de la inducción de tumores vasculares o efectos en la mortalidad a corto plazo de antagomir-92a encapsulado

No se observaron tumores vasculares en los análisis de la autopsia realizados a todos los animales, sugiriendo así la ausencia de supresión sistémica ectópica de microARN-92a en otros órganos a distancia. La mortalidad del estudio

fue de 23 %. No se observaron diferencias en la mortalidad a corto plazo. Solo murió un minicerdo asignado a antagomir-92a encapsulado ($p=0,39$).

Tabla 4

N= 26	Solución salina (n=9)	Placebo ME (n=9)	Antagomir-92a ME (n=8)
seguimiento de 1 mes	6	7	7
Muerte	3	2	1

5 Ejemplo 11: Estudio del perfil proarrítmico de antagomir-92a encapsulado.

Con el fin de conocer el potencial arritmogénico de antagomir-92a encapsulado, se registraron todos los eventos arrítmicos durante los procedimientos y se analizaron por el software Collect 5S (GE). Además, para tratar esta cuestión, se implantó aleatoriamente un grabador de ciclo insertable en 10 de los 26 minicerdos del estudio para detectar los posibles episodios de arritmia hasta el sacrificio, un mes después del infarto y tratamiento. No se observó mayor número de taquiarritmias malignas ni bradiarritmias en el grupo tratado en comparación con los controles, que indica que el antagomir-92a encapsulado intracoronario no ejerce un efecto proarrítmico.

10

Tabla 5: Arritmias detectadas durante el estudio

	Solución salina (n=9)	Placebo ME (n=9)	Antagomir-92a ME (n=8)	p
<i>Fase isquémica (n= 26)</i>				
Sin arritmias, n (%)	2 (22,2)	0	1 (12,5)	0,37
Arritmias, n (%)	7 (77,8)	(100)	7 (87,5)	
PVC, n	5	7	5	
	0	1	1	
NSVT, n	3	3	3	
Fibrilación ventricular, n				
<i>Fase de reperusión (n=26)</i>				
Sin arritmias, n (%)	5 (55,6)	3 (33,3)	3 (37,5)	0,6
Arritmias, n (%)	4 (44,4)	6 (66,7)	5 (62,5)	
Pausas sinusales, n	1	1	0	
Ritmo nodal, n	1	0	0	
IVR, n	0	2	1	
PVC, n	4	3	3	
NSVT, n	0	0	1	
<i>Durante 30 días después de IAM (n=10)</i>				
<i>Registrador de ciclo implantable</i>	n=4	n=3	n=3	0,88
Sin arritmias, n (%)	0(0)	0 (0)	0(0)	0,38
Arritmias, n (%)	2 (50)	3 (100)	3(100)	
Taquicardia sinusal	2	3	3	
	0	1	0	
Pausa sinusal	0	0	1	

	Solución salina (n=9)	Placebo ME (n=9)	Antagomir-92a ME (n=8)	p
PVC o PSVC	2(50)	0	0	
No evaluable				

PVC: complejos ventriculares prematuros, NSVT: taquicardia ventricular no sostenida,

IVR: ritmo idioventricular,

PSVC: complejos supraventriculares prematuros

IAM: infarto agudo de miocardio

Ejemplo 12: Evaluación de los efectos de antagomir 92a encapsulado y antagomir-92a no encapsulado sobre la expresión de miR92a *in vitro*.

12.1: Material y método

a. Células

- 5 Se ha usado la línea de células de la vena umbilical humana, EA.hy926, establecida fusionando células de la vena umbilical humana primarias con un clon resistente a tioguanina de células de pulmón A549 (ATCC® CRL-2922™).

b. Tratamiento

- 10 Se sembraron aproximadamente 500.000 células EA.hy926 sobre seis placas de pocillos y se incubaron en condición normal (37 °C, 5 % de CO₂) en RPMI 1640 complementado en 10 % de suero bovino fetal (FBS) y L-glutamina 2 mM (Sigma, L'Isle d'abeau, Francia). Entonces se sustituyó el medio por medio RPMI completo fresco que contenía los antagomires respectivos y sus controles respectivos (PBS o microesferas). Se han tratado células EA.hy926 con cualquiera, antagomir 92a (libre y tres lotes de microesferas de antagomir-92a), antagomir 17 encapsulado o antagomir 20 encapsulado a 10 y 150 nM. Las células se incubaron durante 24 h adicionales antes de la recogida para la extracción de ARN. Se extrajo ARN total y se cuantificó la expresión de miARN por medio de RT-PCR cuantitativa.

c. Extracción de ARN

- 20 Se aislaron miARN de células EA.hy926 y tejidos de mini-cerdo usando mini-preparaciones de Qiagen RNeasy (ref. 74106) y kits universales RNeasy+ (ref. 73404), respectivamente, según instrucciones del fabricante (Qiagen, Courtaboeuf, Francia). Se evaluaron la cantidad y pureza de ARN extraído usando un espectrofotómetro NanoDrop ND 1000 (Labtech International, París, Francia).

d. Transcripción inversa de miARN

- 25 Se transcribieron de forma inversa miARN, usando el kit de transcripción inversa TaqMan MicroRNA (Life Technologies, ref. 4366596), en un volumen final de 15 µl que contenía 5 ng de ARN total y la sonda de miARN específica. Las muestras se incubaron a 16 °C durante 30 min y 42 °C durante 30 min, y la transcriptasa inversa se inactivó calentando a 85 °C durante 5 min y enfriando a 4 °C constantemente.

e. RT-PCR en tiempo real

- 30 Base teórica. Se obtienen valores cuantitativos del número Ct al que empieza el aumento en la señal asociada al crecimiento exponencial de productos de PCR (usando el software QuantStudio 6 y 7 Flex, según el manual del fabricante). Para controlar las diferencias en las cantidades de material de partida, los datos se normalizaron a la media geométrica de 2 controles endógenos (miARN103 y miARN191), cuyos niveles de expresión se ha mostrado empíricamente que no cambian en función del tratamiento. El valor del miARN diana se normalizó posteriormente de forma que el valor del miARN diana en el control fuera igual a un valor de 1. Los resultados se expresaron usando el método de cálculo de $\Delta\Delta Ct$ (software de análisis RQ, Applied Biosystems®).

- 35 Amplificación por PCR. Todas las reacciones de PCR se realizaron usando un sistema de PCR en tiempo real QuantStudio™ 6 Flex y sondas de TaqMan (Applied Biosystems®). Las condiciones de ciclado térmico comprendieron una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min y 45 ciclos a 95 °C durante 15 s y 65 °C durante 1 min. Las muestras se probaron por duplicado.

12.1: Resultados

- 40 Se inhibe la expresión de miR-92a por tanto antagomir-92a libre como encapsulado a 10 nM con una reducción aproximada de 90 %.

La expresión de miR-92a es indetectable después de tanto antagomir-92a libre como encapsulado a 150 nM.

Ni la expresión de miR-17 ni de miR-20a se redujo significativamente por el tratamiento con antagomir-92a.

Estos datos se resumen en la Figura 11.

Ejemplo 13: Evaluación *in vitro* de los efectos de tres antagomires encapsulados (antagomir 17, 20a y 92a) sobre su expresión respectiva de miR.

5 13.1 Preparación de microesferas cargadas con antagomir-17

10 Se prepararon microesferas por un método de emulsión/evaporación de disolvente usando un copolímero de PLGA 50:50 (i.v. 0,2 dl/g). Se emulsionó una disolución de antagomir-17 (HSA-miR-17-5p; masa molecular: 5305 Da; secuencia: CTGCACTGTAAGCACT; de Exiqon) en la disolución orgánica de PLGA. La emulsión obtenida se incorporó a su vez en una fase acuosa de dispersión y se homogeneizó para obtener el tamaño de partículas deseado. Finalmente, después de la evaporación del disolvente, se liofilizaron las microesferas obtenidas. El diámetro promedio de las microesferas fue 10 µm y el contenido de antagomir-17 fue 7,3 %.

13.2 Preparación de microesferas cargadas con antagomir-20a

15 Se prepararon microesferas por un método de emulsión/evaporación de disolvente usando un copolímero de PLGA 50:50 (i.v. 0,2 dl/g). Se emulsionó una disolución de antagomir-20a (HSA-miR-20a; masa molecular: 5289 Da; secuencia: CTGCACTATAAGCACT; de Exiqon) en la disolución orgánica de PLGA. La emulsión obtenida se incorporó a su vez en una fase acuosa de dispersión y se homogeneizó para obtener el tamaño de partículas deseado. Finalmente, después de la evaporación del disolvente, se liofilizaron las microesferas obtenidas. El diámetro promedio de las microesferas fue 10 µm y el contenido de antagomir-20a fue 6,8 %.

13.3 Resultados

20 El material y método es el mismo que en el Ejemplo 12.

- miR-17 se inhibe a 76 % por antagomir-17 encapsulado a 10 nM. Se suprime totalmente la expresión de miR17 por tratamiento con antagomir-17 encapsulado a 150 nM.
- miR-20a se inhibe a 7 % por tratamiento con antagomir-20a encapsulado a 10 nM y a 87 % por tratamiento con antagomir-20a encapsulado a 150 nM.

25 Los resultados se representan en la Figura 12.

Ejemplo 14: Evaluación *in vitro* de tres lotes de microesferas de antagomir-92a, con las características de carga, tamaño y relación lactida/glicolida.

14.1 Preparación de microesferas con carga baja de antagomir-92a (L13250 : Polímero: RESOMER RG502H)

30 Se prepararon microesferas por un método de emulsión/evaporación de disolvente usando un copolímero de PLGA 50:50 (i.v. 0,2 dl/g) como se describe en el Ejemplo 1, pero usando cantidad de fármaco inicial más baja y una velocidad de agitación más alta con el fin de preparar microesferas más pequeñas con un bajo contenido de antagomir-92a. El diámetro promedio de las microesferas fue 7 µm y el contenido de antagomir-92a fue 1,5 %.

14.2 Preparación de microesferas con carga alta de antagomir-92a (L13262 : Polímero: RESOMER RG502H)

35 Se prepararon microesferas por un método de emulsión/evaporación de disolvente usando un copolímero de PLGA 50:50 (i.v. 0,2 dl/g) como se describe en el Ejemplo 1, pero usando cantidad de fármaco inicial más alta y una velocidad de agitación más baja con el fin de preparar microesferas mayores con alto contenido de antagomir-92a. El diámetro promedio de las microesferas fue 15,6 µm y el contenido de antagomir-92a fue 9,8 %.

14.3 Preparación de microesferas cargadas con antagomir-92a usando un polímero de larga duración (L13230: Polímero : LACTEL B6006)

40 Se prepararon microesferas por un método de emulsión/evaporación de disolvente como se describe en el Ejemplo 1, pero usando un copolímero de PLGA 85:15 con un alto peso molecular (i.v. 0,64 dl/g), previsto para una liberación de fármaco lenta. El diámetro promedio de las microesferas fue 12 µm y el contenido de antagomir-92a fue 3,1 %.

14.4 Resultados

45 Se probaron los tres lotes de microesferas de antagomir-92a, con las características de carga, tamaño y relación lactida/glicolida.

Según el contenido de microesferas, L13250 se ha probado a 2 y 30 nM, L13262 a 14 y 210 nM, y L13230 a 4 y 66 nM,

L13250, L13262 y L13230 suprimieron totalmente la expresión de miR92a.

ES 2 688 160 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> PIERRE FABRE MEDICAMENT
FUNDACIO HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HERBRON-INSTITUT DE RECERCA
- 5 <120> Composición que comprende un antagomir encapsulado
- <130> BR96786-PFM
- <150>EP 13 305 082.3
- 10 <151> 24-01-2013
- <160> 60
- <170> PatentIn versión 3.5
- 15 <210> 1
- <211> 78
- <212> ARN
- <213> Homo sapiens
- 20 <400> 1
- | | |
|--|----|
| uuuuuuuacac agguugggau cgguugcaau gcuguguuuc uguaugguau ugcacuuguc | 60 |
| ccggccuguu gaguuugg | 78 |
- 25 <210> 2
- <211> 75
- <212> ARN
- <213> Homo sapiens
- 30 <400> 2
- | | |
|--|----|
| ucauuccugg guggggauuu guugcauuac uuguguuucua uauaaaguau ugcacuuguc | 60 |
| ccggccugug gaaga | 75 |
- <210> 3
- 35 <211> 96

ES 2 688 160 T3

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 3

5

cgggccccgg gcgggcggga gggacgggac gcggugcagu guuguuuuuu cccccgcaa 60
 uauugcacuc gucccggccu ccggccccc cgcccc 96

<210> 4

<211> 84

10

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 4

15

gucagaauaa ugucaaagug cuuacagugc agguagugau augugcaucu acugcaguga 60
 aggcacuugu agcauuugg ugac 84

<210> 5

<211> 71

20

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 5

25

ugcccuagca gcgggaacag uucugcagug agcgaucggu gcucuggggu auuguuuccg 60
 cugccagggg a 71

<210> 6

<211> 89

30

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 6

gucagcagug ccuuagcagc acguaaaauu uggcguaaag auucuaaaau uaucuccagu 60
 auuaacugug cugcugaagu aagguugac 89

ES 2 688 160 T3

	<210> 7		
	<211> 81		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
5	<400> 7		
	guuccacucu agcagcacgu aaauauuggc guagugaaau auauauuaaa caccaauuu	60	
	acugucugc uuuaguguga c	81	
10	<210> 8		
	<211> 72		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
15	<400> 8		
	uacaucggcc auauauaac aaccugauaa guguuauagc acuuaucaga uuguauugua	60	
	auugucugug ua	72	
20	<210> 9		
	<211> 72		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
25	<400> 9		
	acucggaugg auauauaca accugcuaag uguccuagca cuuagcaggu uguauuauca	60	
	uuguccgugu cu	72	
30	<210> 10		
	<211> 70		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 10		

ES 2 688 160 T3

	acacggacaa ugauaaauaca accugcuaag ugcuaaggaca cuuagcaggu uguauuuauu	60
	ccauccgagu	70
	<210> 11	
	<211> 68	
5	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 11	
	cuccggugcc uacugagcug auaucaguuc ucauuuuaca cacuggcuca guucagcagg	60
10	aacaggag	68
	<210> 12	
	<211> 73	
	<212> ARN	
15	<213> Homo sapiens	
	<400> 12	
	cucugccucc cgugccuacu gagcugaaac acaguugguu uguguacacu ggcucaguuc	60
20	agcaggaaca ggg	73
	<210> 13	
	<211> 76	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 13	
	gagggggaag acgggagga agaagggagu gguuccauca cgccuccuca cuccucuccu	60
	cccguuuuuu ccucuc	76
30	<210> 14	
	<211> 110	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	

ES 2 688 160 T3

<400> 14

ggccagcugu gaguguuucu uuggcagugu cuuagcuggu uguugugagc aauguaagg 60

aagcaaucag caaguauacu gcccuagaag ugcugcacgu uguggggccc 110

5 <210> 15

<211> 84

<212> ARN

<213> Homo sapiens

10 <400> 15

gugcucgguu uguaggcagu gucauuagcu gauuguacug ugguguuac aaucacuaac 60

uccacugcca ucaaaaacaag gcac 84

<210> 16

15 <211> 77

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 16

20

agucuaguua cuaggcagug uaguuagcug auugcuaaua guaccaauca cuaaccacac 60

ggccagguua aaagauu 77

<210> 17

25 <211> 71

<212> ARN

<213> Homo sapiens

<400> 17

30

guagcacuaa agugcuuuaa gugcagguag uguuuaguua ucuacugcau uaugagcacu 60

uaaaguacug c 71

<210> 18

<211> 69

ES 2 688 160 T3

<212> ARN
 <213> Homo sapiens

<400> 18

5

aguaccaaag ugcucauagu gcagguaguu uuggcaugac ucuacuguag uaugggcacu 60
 uccaguacu 69

<210> 19
 <211> 83

10 <212> ARN
 <213> Homo sapiens

<400> 19

15 ccuuggagua aaguagcagc acauaauggu uugggauuu ugaaaaggug caggccauu 60
 ugugcugccu caaaaauaca agg 83

<210> 20
 <211> 98
 <212> ARN

20 <213> Homo sapiens

<400> 20

25 uugaggccuu aaaguacugu agcagcacau caugguuuac augcuacagu caagaugcga 60
 aucauuuuu gcugcucuag aaauuaagg aaauucau 98

<210> 21
 <211> 22
 <212> ARN

30 <213> Homo sapiens

<400> 21
 uauugcacuu gucccggccu gu 22

<210> 22

ES 2 688 160 T3

<211> 23
<212> ARN
<213> Homo sapiens

5 <400> 22
agguugggau cgguugcaau gcu 23

<210> 23
<211> 22
10 <212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 23
ggguggggau uuguugcauu ac 22

15 <210> 24
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

20 <400> 24
uauugcacuc gucccggccu cc 22

<210> 25
25 <211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 25
30 agggacggga cgcgugcag ug 22

<210> 26
<211> 22
<212> ARN
35 <213> Homo sapiens

<400> 26

ES 2 688 160 T3

acugcaguga aggcacuugu ag 22

<210> 27
<211> 23
5 <212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 27
caaagugcuu acagugcagg uag 23
10

<210> 28
<211> 23
<212> ARN
<213> Homo sapiens
15

<400> 28
gggguaauugu uuccgcugcc agg 23

<210> 29
20 <211> 23
<212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 29
25 uagcagcggg aacaguucug cag 23

<210> 30
<211> 22
<212> ARN
30 <213> Homo sapiens

<400> 30
ccaguaauaa cugugcugcu ga 22

35 <210> 31
<211> 22
<212> ARN

ES 2 688 160 T3

<213> Homo sapiens

<400> 31
ccaauauuac ugugcugcuu ua 22

5

<210> 32
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

10

<400> 32
uagcagcacg uaaauauugg cg 22

<210> 33
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

15

<400> 33
cuuauacagau uguauuguaa uu 22

20

<210> 34
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

25

<400> 34
uuauauaca accugauaag ug 22

30

<210> 35
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

35

<400> 35
cuuagcaggu uguauuauca uu 22

ES 2 688 160 T3

<210> 36
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens
5
<400> 36
auauauaca accugcuaag ug 22

<210> 37
10 <211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 37
15 cacuuagcag guuguauuau au 22

<210> 38
<211> 22
<212> ARN
20 <213> Homo sapiens

<400> 38
auaaauacaac cugcuaagug cu 22

<210> 39
25 <211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 39
30 uggcucaguu cagcaggaac ag 22

<210> 40
<211> 22
35 <212> ARN
<213> Homo sapiens

ES 2 688 160 T3

<400> 40
ugccuacuga gcugauauca gu 22

5 <210> 41
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

10 <400> 41
uggcucaguu cagcaggaac ag 22

15 <210> 42
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 42
ugccuacuga gcugaaacac ag 22

20 <210> 43
<211> 21
<212> ARN
<213> Homo sapiens

25 <400> 43
ucacuccucu ccucccgucu u 21

30 <210> 44
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

35 <400> 44
aagacgggag gaaagaaggg ag 22

<210> 45
<211> 22

ES 2 688 160 T3

<212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 45
5 caaucagcaa guauacugcc cu 22

<210> 46
<211> 22
<212> ARN
10 <213> Homo sapiens

<400> 46
uggcaguguc uuagcugguu gu 22

15 <210> 47
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

20 <400> 47
caaucacuaa cuccacugcc au 22

<210> 48
<211> 23
25 <212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 48
30 uaggcagugu cauuagcuga uug 23

<210> 49
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens
35

<400> 49
aaucacuaac cacacggcca gg 22

ES 2 688 160 T3

<210> 50
<211> 23
<212> ARN
<213> Homo sapiens

5

<400> 50
aggcagugua guuagcugau ugc 23

<210> 51
10 <211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 51
15 acugcauuau gagcacuuaa ag 22

<210> 52
<211> 23
<212> ARN
20 <213> Homo sapiens

<400> 52
uaaagugcuu auagucagg uag 23

25 <210> 53
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

30 <400> 53
acuguaguau gggcacuucc ag 22

<210> 54
<211> 23
35 <212> ARN
<213> Homo sapiens

ES 2 688 160 T3

<400> 54
caaagugcuc auagugcagg uag 23

5 <210> 55
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

10 <400> 55
caggccauau ugugcugccu ca 22

15 <210> 56
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

20 <400> 56
uagcagcaca uaaugguuug ug 22

25 <210> 57
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

30 <400> 57
cgaaucuuua uuugcugcuc ua 22

35 <210> 58
<211> 22
<212> ARN
<213> Homo sapiens

<400> 58
uagcagcaca ucaugguuuu ca 22

<210> 59
<211> 16

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Antagomir

5

<400> 59

ccgggacaag tgcaat 16

<210> 60

10

<211> 16

<212> ARN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Antagomir

15

<400> 60

ccgggacaag ugcaau 16

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una cantidad eficaz de al menos un inhibidor de un miARN involucrado en la angiogénesis y presentación de una actividad antiangiogénica, o su precursor; en el que dicho inhibidor es un oligonucleótido antisentido que es complementario a dicho miARN, o su precursor, y se microencapsula en microesferas poliméricas biodegradables y biocompatibles, en la que dichas microesferas están hechas de un copolímero seleccionado de entre poli-d,l-lactida (PLA) y poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA), combinándose dicho polímero opcionalmente con uno o varios de otros polímeros.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho miARN se selecciona en la familia que comprende miR-92 (incluyendo miR-92a-1, miR-92a-2 y miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (incluyendo miR-16-1 y miR-16-2), miR-374 (incluyendo miR-374a, miR-374b y miR-374c), miR-24 (incluyendo miR-24-1 y miR-24-2), miR-483, miR-34 (incluyendo miR-34a, miR-34b y miR-34c), miR-20 (incluyendo miR-20a y miR-20b), miR-15 (incluyendo miR-15a y miR-15b).
3. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho miARN consiste en la forma madura:
- a) miR-92a que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 21, 22 o 23 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 21, 22 o 23;
- b) miR-92b que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 24 o 25 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 24 o 25;
- c) miR-17 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 26 o 27 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 26 o 27;
- d) miR-503 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 28 o 29 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 28 o 29;
- e) miR-16 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 30, 31 o 32 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 30, 31 o 32;
- f) miR-374 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 33, 34, 35, 36, 37 o 38 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 33, 34, 35, 36, 37 o 38;
- g) miR-24 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 39, 40, 41 o 42 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 39, 40, 41 o 42;
- h) miR-483 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 43 o 44 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 43 o 44;
- i) miR-34 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 45, 46, 47, 48, 49 o 50 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 45, 46, 47, 48, 49 o 50;
- j) miR-20 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 51, 52, 53 o 54 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 51, 52, 53 o 54; y
- k) miR-15 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 55, 56, 57 o 58 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con una de SEQ ID NO. 55, 56, 57 o 58.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho precursor de miARN consiste en:
- a) mir-92a-1 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 1, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 1;
- b) mir-92a-2 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 2, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 2;
- c) mir-92b que comprende la secuencia SEQ ID NO. 3, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 3;
- d) mir-17 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 4 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 4;
- e) mir-503 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 5 o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 5;

- f) mir-16-1 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 6, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 6; y
- g) mir-16-2 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 7, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 7
- 5 h) mir-374a que comprende la secuencia SEQ ID NO. 8, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 8
- i) mir-374b que comprende la secuencia SEQ ID NO. 9, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 9
- 10 j) mir-374c que comprende la secuencia SEQ ID NO. 10, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 10
- k) mir-24-1 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 11, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 11
- l) mir-24-2 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 12, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 12
- 15 m) mir-483 que comprende la secuencia SEQ ID NO. 13, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 13
- n) mir-34a que comprende la secuencia SEQ ID NO. 14, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 14
- 20 o) mir-34b que comprende la secuencia SEQ ID NO. 15, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 15
- p) mir-34c que comprende la secuencia SEQ ID NO. 16, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 16
- q) mir-20a que comprende la secuencia SEQ ID NO. 17, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 17
- 25 r) mir-20b que comprende la secuencia SEQ ID NO. 18, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 18
- s) mir-15a que comprende la secuencia SEQ ID NO. 19, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 19, y
- 30 t) mir-15b que comprende la secuencia SEQ ID NO. 20, o una secuencia que tiene al menos 90 % de identidad de nucleótidos con SEQ ID NO. 20.
5. La composición de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho inhibidor de un miARN es un oligonucleótido antisentido de 8-49 nucleótidos de longitud que tiene una secuencia dirigida a dicho miARN, o su precursor.
6. La composición de la reivindicación 5, en la que dicho oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido que es al menos parcialmente complementario a la secuencia del miARN diana, o su precursor.
- 35 7. La composición de la reivindicación 5, en la que dicho oligonucleótido antisentido se selecciona del grupo que consiste en un ribonucleótido, un desoxirribonucleótido, un ARN pequeño, un antagomir, un LNA, un PNA, un oligonucleótido de morfolino o una combinación de los mismos.
8. La composición de la reivindicación 5, en la que dicho oligonucleótido antisentido es un antagomir.
- 40 9. La composición de la reivindicación 8, en la que dicho antagomir comprende una secuencia de nucleótidos que comprende al menos 16 nucleótidos contiguos complementarios a los nucleótidos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO. 1 a 58.
10. La composición de la reivindicación 9, en la que dicho antagomir comprende la secuencia SEQ ID NO. 59 o 60 y modificaciones que excluyen sustituciones de bases de la misma, y fragmentos que consisten en subsecuencias de SEQ ID NO: 59 o 60 de al menos 8 nucleótidos contiguos de la misma.
- 45 11. La composición de las reivindicaciones 1 a 10, en la que dichas microesferas presentan un diámetro que no supera 25 μm .
12. La composición de las reivindicaciones 1 a 10, en la que al menos 50 % de dichas microesferas presentan un diámetro comprendido entre 5 y 20 μm , preferencialmente entre 5 y 15 μm .

13. La composición de las reivindicaciones 1 a 12, en la que las microesferas incorporan desde 1 % hasta 15 % p/p de inhibidor.
14. La composición de las reivindicaciones 1 a 12, en la que las microesferas incorporan desde 1 % hasta 10 % p/p de inhibidor.
- 5 15. La composición de las reivindicaciones 1 a 14, en la que dichas microesferas están hechas de una mezcla de polímeros que consisten en poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA) y poli-d,l-lactida (PLA).
16. La composición de la reivindicación 15, en la que la relación de lactida:glicolida en el polímero de PLGA comprende entre 50:50 y 95:5 de relación molar.
- 10 17. La composición de las reivindicaciones 15 o 16, en la que la viscosidad inherente del polímero comprende entre 0,1 y 0,70 dl/g.
18. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en el tratamiento del infarto de miocardio.
19. La composición de la reivindicación 18, en la que dicho infarto de miocardio consiste en infarto agudo de miocardio.
- 15 20. La composición de las reivindicaciones 1 a 17 para su uso para invertir o prevenir la remodelación ventricular en un sujeto en necesidad del mismo.
21. Una población de microesferas biodegradables y biocompatibles para su uso en el tratamiento o la prevención de infarto de miocardio, en la que dichas microesferas:
- tienen un diámetro promedio comprendido entre 5 y 15 μm ;
- 20 - están hechas de poli-d,l-lactida-co-glicolida (PLGA); poli-d,l-lactida (PLA) o una mezcla de las mismas;
- incorporan desde 1 % hasta 15 p/p de un agente terapéutico capaz de prevenir la remodelación ventricular,
- 25 en la que dicho agente terapéutico consiste en un inhibidor de un miARN seleccionado del grupo que consiste en miR-92 (incluyendo miR-92a-1, miR-92a-2 y miR-92b), miR-17, miR-503, miR-16 (incluyendo miR-16-1 y miR-16-2), miR-374 (incluyendo miR-374a, miR-374b y miR-374c), miR-24 (incluyendo miR-24-1 y miR-24-2), miR-483, miR-34 (incluyendo miR-34a, miR-34b y miR-34c), miR-20 (incluyendo miR-20a y miR-20b), miR-15 (incluyendo miR-15a y miR-15b) y más preferencialmente miR-92a, o su precursor.
22. Las microesferas de la reivindicación 21, en las que dicho inhibidor es un antagonista.
- 30 23. Un kit que comprende al menos i) una composición según la reivindicación 1 a 17 y/o microesferas según las reivindicaciones 21 o 22 y ii) una jeringa o vial o ampolla en el que se dispone la composición.
24. El kit de la reivindicación 25, que comprende además un disolvente dispuesto en un recipiente de disolvente.

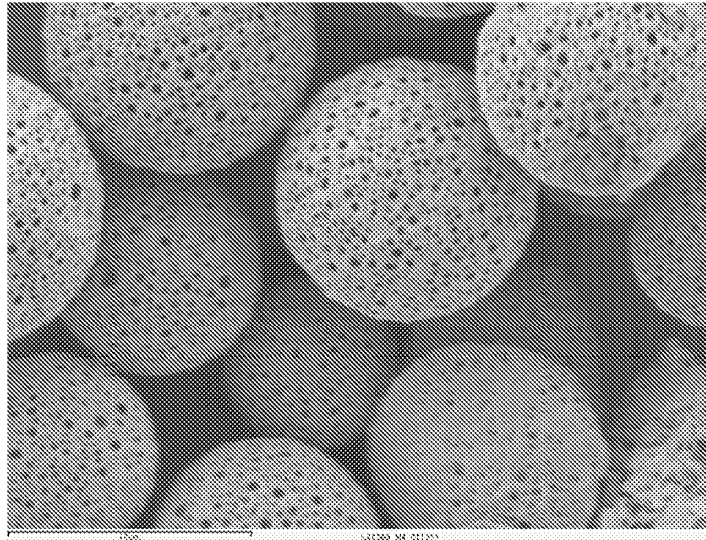


Figura 1

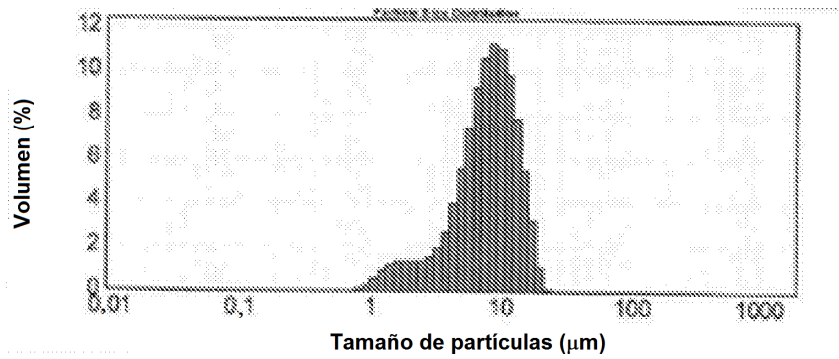


Figura 2

Administración de microesferas de albúmina: 15 mg x 6 + 30 mg x 1 + SF 10 ml + SF 20 ml + Isq 5 min / Rep 10 min

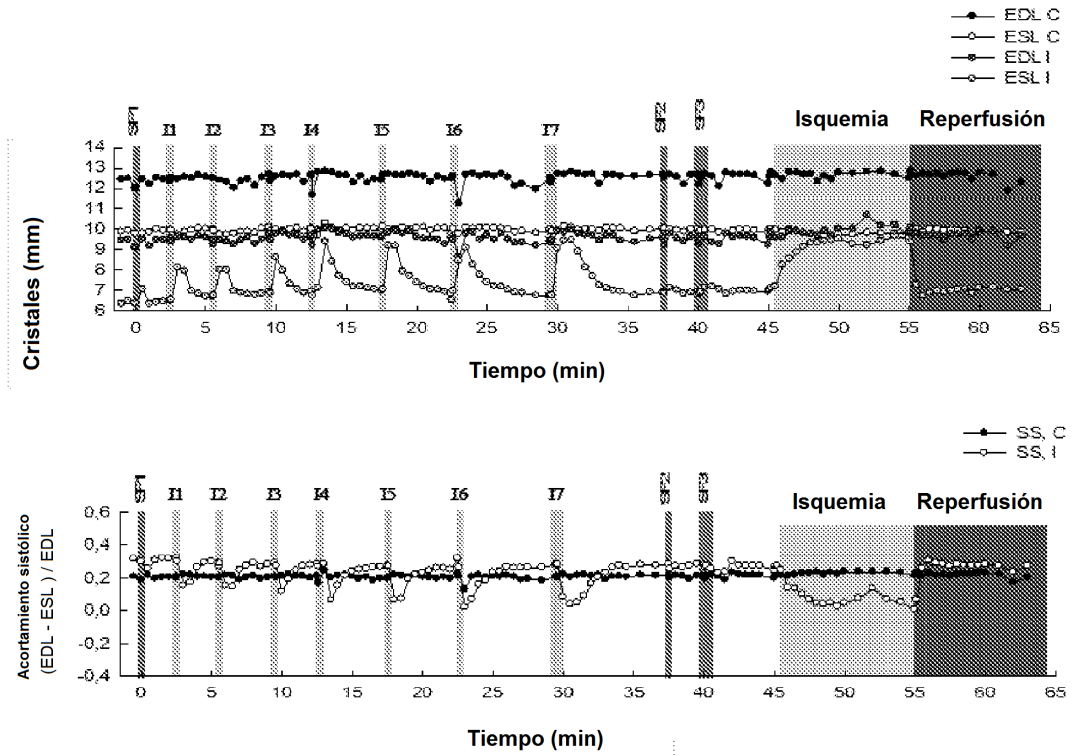


Figura 3

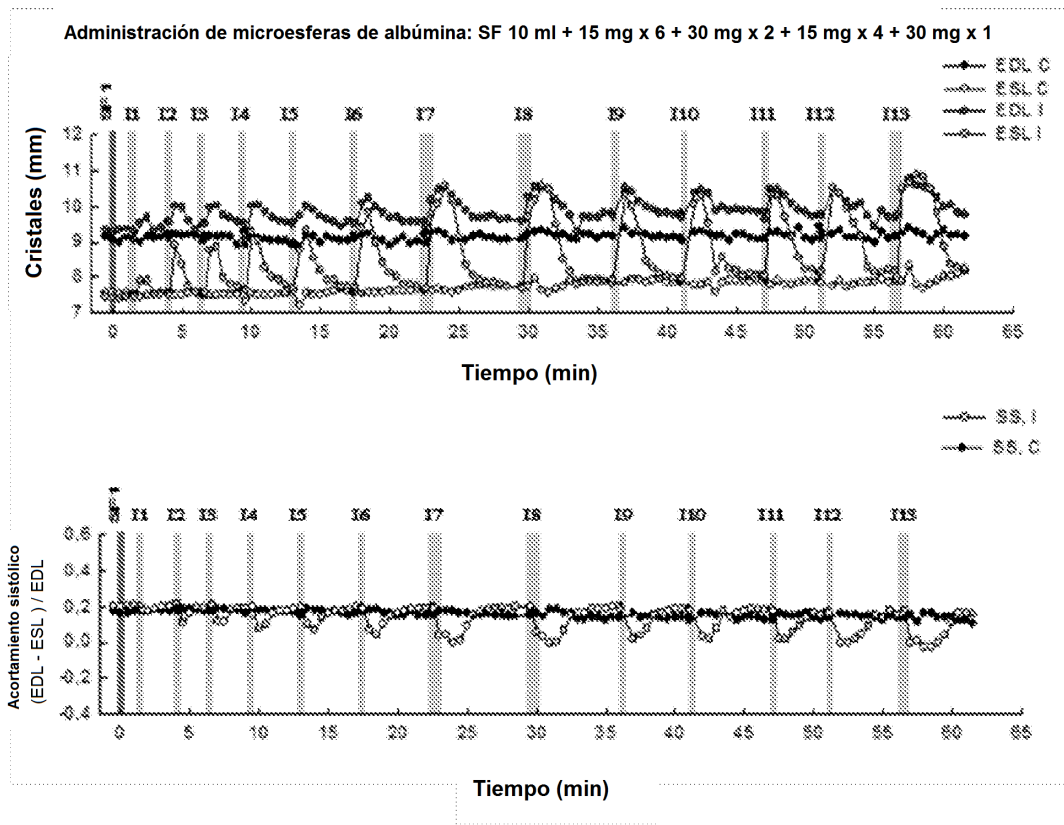


Figura 4

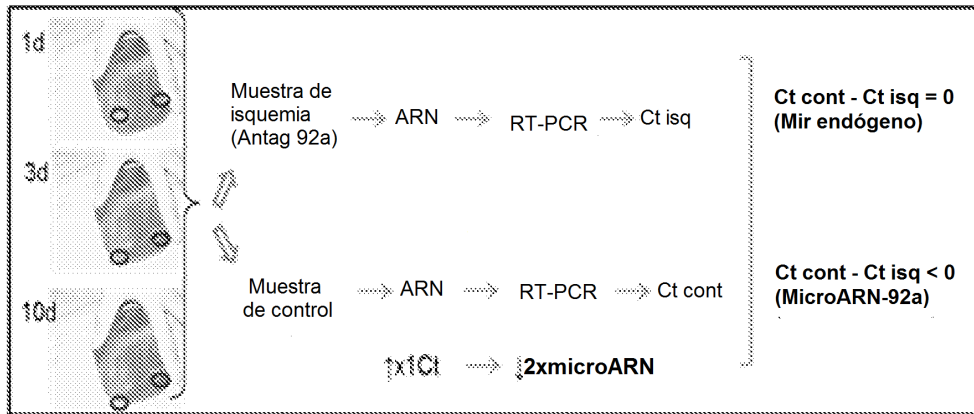


Figura 5

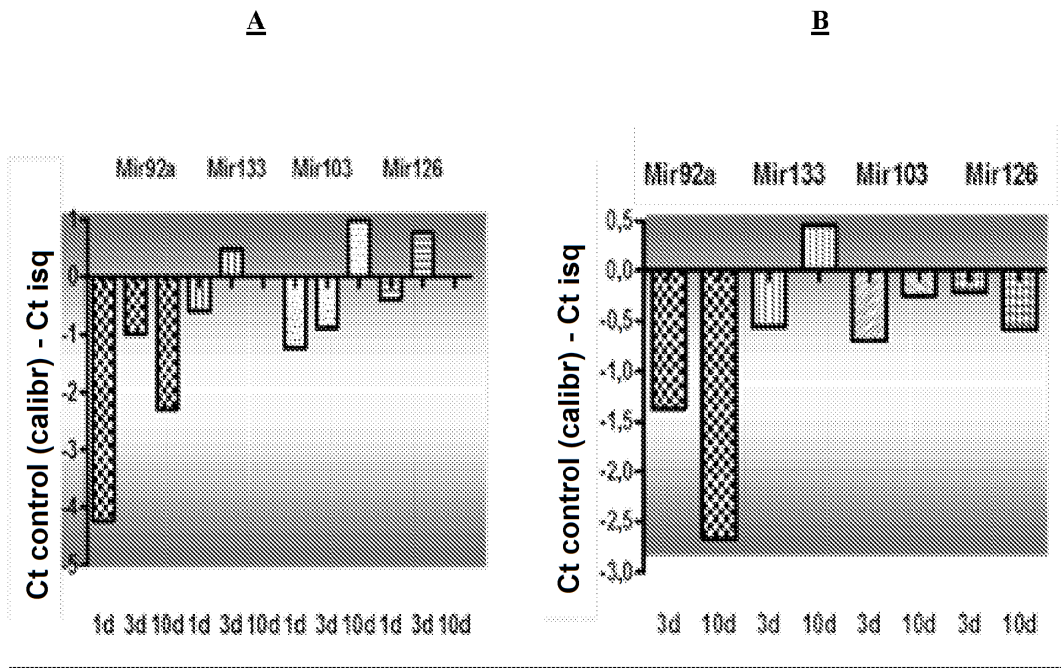


Figura 6

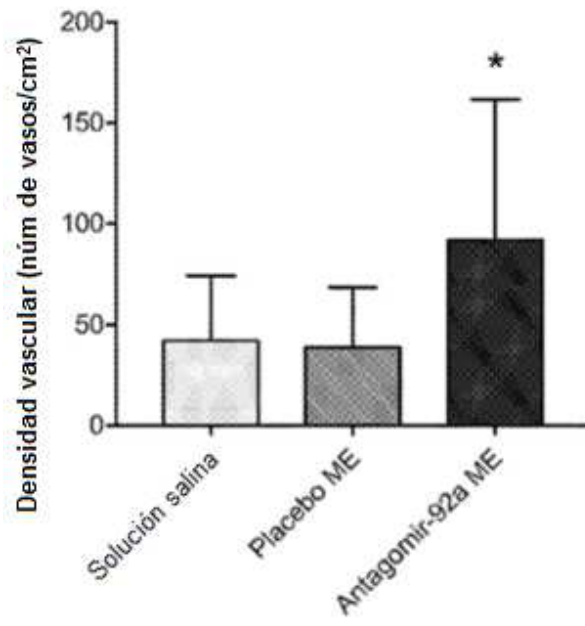


Figura 7

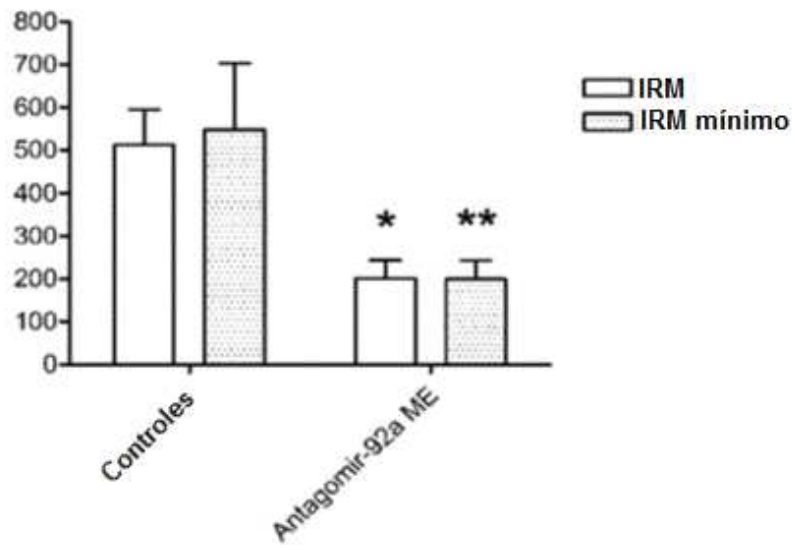


Figura 8

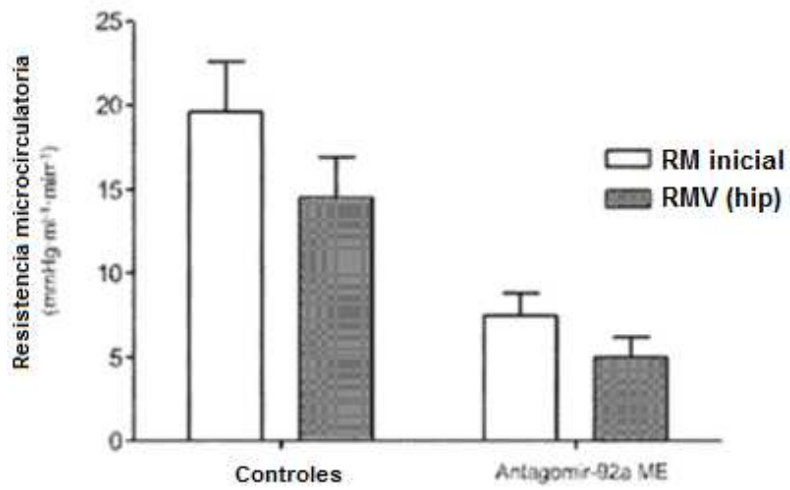


Figura 9

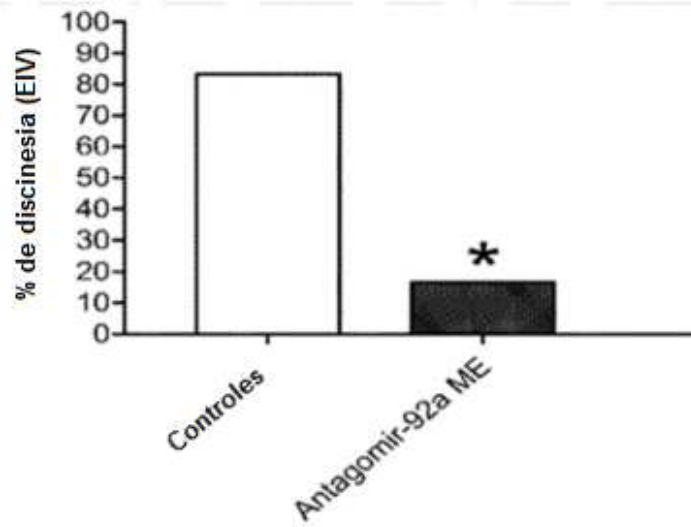


Figura 10

Tratamiento con antagomir 92a

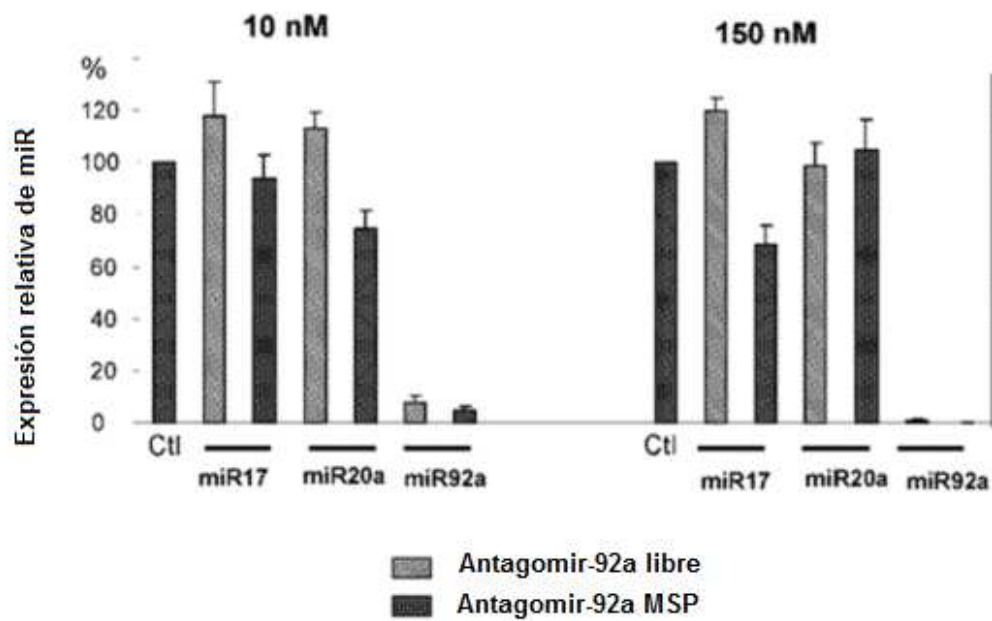


Figura 11

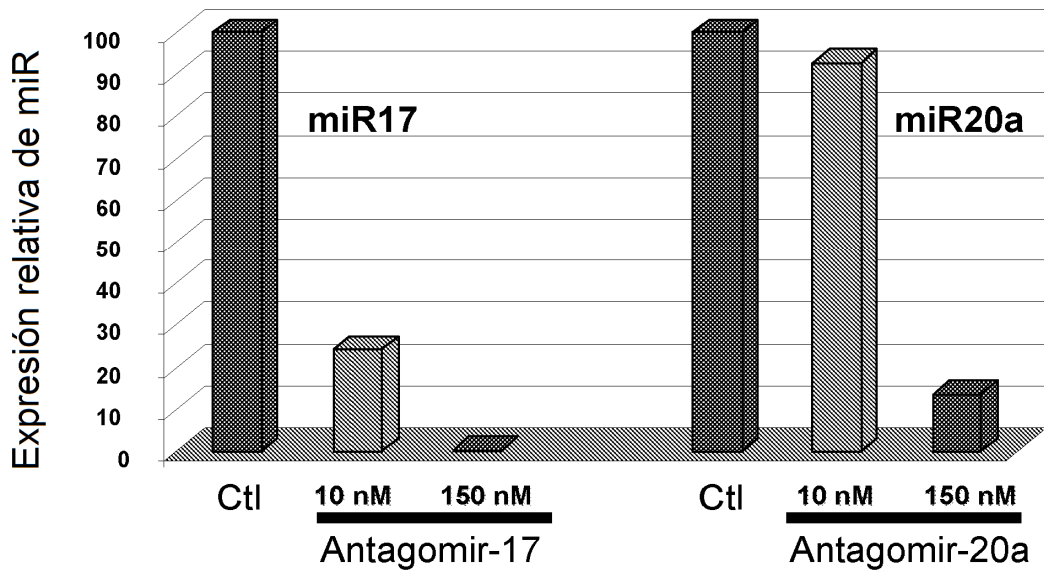


Figura 12