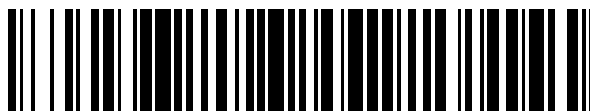


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 198**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2011** **PCT/EP2011/055122**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2011** **WO11121120**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2011** **E 11711597 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018** **EP 2552454**

54 Título: **Antagonistas de la expresión de ARNmi-29 y su uso en la prevención y el tratamiento de aneurismas aórticos**

30 Prioridad:

01.04.2010 EP 10003675

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

19.11.2018

73 Titular/es:

**JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT
(100.0%)**

**Grüneburgplatz 1
60323 Frankfurt am Main, DE**

72 Inventor/es:

**ZEIHER, ANDREAS;
DIMMELER, STEFANIE y
BOON, REINIER**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 690 198 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

Antagonistas de la expresión de ARNmi-29 y su uso en la prevención y el tratamiento de aneurismas aórticos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a antagonistas de la expresión y/o la función del micro ARN ARNmi-29 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de aneurismas aórticos. Se desvela además una composición farmacéutica que comprende dichos antagonistas de ARNmi-29 y su uso para prevenir y tratar la formación de aneurismas aórticos relacionados con la edad en un sujeto en necesidad de dicho tratamiento.

Antecedentes de la invención

10 La extensión de hoy en día de la esperanza de vida humana viene a costa de la prevalencia aumentada de enfermedades cardiovasculares asociadas al envejecimiento (Lakatta EC. Age-associated cardiovascular changes in health: impact on cardiovascular disease in older persons. Heart Fail Rev. 2002;7:29-49). Una afección particular con alta mortalidad es la formación de aneurismas aórticos y la posterior ruptura del vaso aórtico. El aneurisma aórtico (AA) es una enfermedad típica asociada al envejecimiento que afecta aproximadamente a un 9 % de los hombres ancianos y da lugar a un número significativo de muertes (Singh K, Bonaa KH, Jacobsen BK, Bjork L, Solberg S. Prevalence of and Risk Factors for Abdominal Aortic Aneurysms in a Population-Based Study: The Tromso Study. Am J Epidemiol. 2001;154:236-244).

15 La incidencia de AA aún está en aumento indicando que las estrategias de cuidado de la salud preventivas primarias actuales no son suficientemente eficaces reduciendo el AA. La cirugía está actualmente en el tratamiento del estado de la técnica, sin embargo, esta intervención quirúrgica se asocia a una morbilidad y mortalidad significativas, por ejemplo, solamente el 10-25 % de los pacientes sobreviven a la ruptura debido a la gran mortalidad pre- y post-operativa. En un nivel mecanicista, el análisis de secciones patológicas humanas reveló que la formación y la ruptura de AA se caracterizan por el adelgazamiento de la pared vascular. La formación disminuida o la destrucción de la matriz extracelular se cree que son los procesos fisiopatológicos clave que dan lugar al adelgazamiento de la pared vascular (Guo DC, Papke CL, He R, Milewicz DM. Pathogenesis of thoracic and abdominal aortic aneurysms. Ann N Y Acad Sci. 2006; 1085:339-352).

20 Los microARN (ARNmi) han emergido recientemente como reguladores clave de varios procesos fisiopatológicos. Los ARNmi son ARN cortos no codificantes que regulan la expresión de proteínas post-transcripcionalmente induciendo la degradación del ARNm marcado como diana o bloqueando la traducción de proteínas. Los ARNmi se expresan como transcritos precursores que se pliegan en una estructura en tallo-lazo. Los ARNmi precursores se digieren secuencialmente a través de las nucleasas Drosha y Dicer para producir el dúplex maduro de ARNmi, que se introduce después en el ARN asociado a ARNmi induciendo el complejo silenciador (RISC). Sin embargo, solamente una cadena del ARNmi maduro se retiene en el complejo y proporcionará la unión al ARNm marcado como diana. Las regiones de secuencia diana dentro del transcrito génico silenciado se encuentran más comúnmente en las regiones sin traducir de los ARNm respectivos; los ARNmi se unen preferentemente en la región 3' sin traducir de su ARNm diana y facilitan la inhibición traduccional o la degradación del ARNm.

25 Aunque varios estudios mostraron que los ARNmi específicos controlan el crecimiento de los vasos y la función cardíaca (Urbich C, Kuehbach A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases; inflammation, and angiogenesis. Cardiovasc Res. 2008;79:581-588), se desconoce la implicación de los ARNmi en la formación de AA y la ruptura de la placa aterosclerótica y el impacto de la edad en la expresión de los ARNmi vasculares.

30 La familia de microARN alrededor del ARNmi-29 se conoce como un regulador clave de la fibrosis en el tejido cardíaco. El documento WO 2009/018 493 muestra que los miembros de la familia de ARNmi-29, ARNmi-29a, b y c, se regulan negativamente en el tejido cardíaco en respuesta al estrés y se regulan positivamente en el tejido cardíaco de ratones que son resistentes tanto a estrés como a fibrosis. La formación de aneurismas aórticos, sin embargo, no se desvela en el documento WO 2009/018 493.

35 De forma similar, el documento WO 2008/042 231 desvela las implicaciones terapéuticas de la expresión del ARNmi en enfermedades del corazón. Se descubrió que la expresión alterada de ARNmi en los cardiomiocitos provoca amplios efectos en la transcripción de diversos genes en el fallo cardíaco. Por ejemplo, miR-1 regula los niveles de expresión de la calmodulina. Las dianas predichas de miR-1 incluyen varias que podrían contribuir a la patogénesis del fallo cardíaco; entre estas están Calm 1 y Calm 2, las isoformas primarias de calmodulina en el corazón. La solicitud sugiere usar ARNmi específicamente expresados en el tejido cardíaco afectado como dianas terapéuticas.

40 El documento WO 2009/018 493 desvela el uso de antagonistas de miR-29a-c como agentes profibróticos para convertir las placas blandas en la vasculatura en tejido fibrótico para prevenir el infarto de miocardio.

45 Varios MicroARN distintos son reguladores clave en la aparición de enfermedades cardíacas. Silvestri y col. revisaron que MiR-29 está implicado en la reacción fibrótica después del infarto de miocardio mientras que miR-21 puede ejercer un papel fundamental en la restenosis post-angioplastia. MiR-208 está implicado en el desplazamiento hacia un patrón de expresión génica fetal en las proteínas contráctiles en el fallo cardíaco. MiR-1 influye en la susceptibilidad a arritmias cardíacas después del infarto de miocardio (Silvestri P y col., MicroRNAs and ischemic

heart disease: towards a better comprehension of pathogenesis, new diagnostic tools and new therapeutic targets. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov. Jun 2009; 4(2);109-18).

La expresión de ARNmi-29 en el infarto de miocardio es el punto de partida de un estudio sobre los efectos protectores de Pioglitazona (un agonista de PPAR-gamma) contra la lesión por reperfusión de isquemia de miocardio. El ARNmi-29a y el ARNmi-29c se expresaron significativamente menos después de la administración de Pioglitazona a ratas. De forma interesante, los antagonistas de ARNmi-29a y ARNmi-29c redujeron significativamente el tamaño del infarto de miocardio y la apoptosis en corazones sometidos a la lesión por IR. Esto se debió probablemente a una expresión aumentada de factores anti apoptóticos (Mcl-2) en el corazón (Ye Y, y col., Down-regulation of microRNA-29 by antisense inhibitors and a PPAR- γ agonist protects against myocardial ischemia-reperfusion injury, Cardiovasc Res. 17 Feb 2010). Adicionalmente, Golledge y col. (en Golledge J, y col. Peroxisome proliferator-activated receptor ligands reduce aortic dilatation in a mouse model of aortic aneurysm. Atherosclerosis. Mayo 2010 (1):51-6. Epub 29 Oct 2009.) desvela que la osteopontina se asocia a los aneurismas aórticos abdominales (AAA) humanos y que los estudios *in vitro* sugieren que esta citocina está regulada negativamente por la ligación al receptor activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR). De forma similar, Jones y col. (en Jones A, y col. Rosiglitazone reduces the development and rupture of experimental aortic aneurysms. Circulation. 23 Jun 2009;119(24):3125-32. Epub 8 Jun 2009). Desvela que la rosiglitazona, un agonista del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma, reduce la expansión o la ruptura del aneurisma. El pretratamiento o el post-tratamiento con rosiglitazona redujeron la expansión y la ruptura aórticas en un modelo de ratón. La reducción de las lesiones en animales pre-tratados con rosiglitazona es concomitante con la expresión disminuida de mediadores inflamatorios. Se describen estudios adicionales porque se necesita elucidar el mecanismo preciso. Sin embargo, en estas publicaciones el efecto de los ligandos o la rosiglitazona o la pioglitazona son completamente independientes de los mecanismos implicados en la presente invención. Aunque no se ha aprobado del todo un tratamiento farmacológico y está disponible un tratamiento de formación de aneurisma aórtico, las modificaciones de los factores de riesgo, así como la terapia preventiva usando estatinas e inhibidores de ACE han reducido la mortalidad debido a la aterosclerosis durante los últimos 15 años. De forma más importante, sin embargo, debido al aumento de la esperanza de vida y la edad aumentada de la población global, se espera que las enfermedades asociadas a la edad como la formación de aneurismas aumenten con el tiempo. Por lo tanto, se necesita desesperadamente un tratamiento eficiente. Los intentos actuales de interferir terapéuticamente con la remodelación anormal de los vasos se centran exclusivamente en domar la respuesta inflamatoria asociada a las alteraciones de las estructuras de la pared vascular. Sin embargo, no hay opciones terapéuticas para modificar la debilidad estructural de la pared de los vasos. Las intervenciones específicas que bloquean las proteinasas que degradan el colágeno o la inhibición dirigida por anticuerpos del reclutamiento de células inflamatorias se tornaron no ser exitosas.

Sumario de la invención

En vista de la técnica anterior descrita anteriormente, y las limitaciones de las estrategias preventivas o curativas actualmente disponibles para aneurismas aórticos, el objeto de la presente invención fue proporcionar nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas para la prevención y/o el tratamiento de la formación de aneurismas aórticos a menudo diagnosticados en gente anciana.

En un primer aspecto el problema anterior se resuelve por un antagonista de la expresión y/o la función del ARNmi-29 que es un oligonucleótido antisentido complementario al ARNmi-29 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la formación de aneurisma aórtico en un mamífero, preferentemente un humano. Usando un enfoque bioinformático, los inventores sorprendentemente descubrieron que la familia mir-29 (mir-29 a, b y c) es la única de los 20 ARNmi regulados que se estudia en el contexto de la presente invención que afecte funcionalmente a los niveles de ARNm en la aorta de ratones envejecidos, en comparación con ratones jóvenes.

La formación de aneurismas aórticos está provocada por la degradación del colágeno, la fibrilina, la apoptosis de las células del músculo liso vascular y el reclutamiento de células inflamatorias.

Los antagonistas de la invención descrita en el presente documento son particularmente útiles para la prevención de enfermedades y eventos que implican la debilitación de los vasos arteriales tales como el infarto de miocardio agudo, la angina inestable, la enfermedad oclusiva arterial periférica, el ictus isquémico, la formación de aneurisma aórtico y la ruptura aórtica. Preferentemente, los antagonistas de la presente invención se usan para la prevención y/o el tratamiento de afecciones, que comprenden i) formación de aneurisma en la aorta debido a aterosclerosis, ii) formación de aneurisma en la aorta debido a causas genéticas, por ejemplo en el Síndrome de Marfan, iii) formación de aneurisma en pacientes con formación de la válvula aórtica bicúspide y iv) formación de aneurisma aórtico dependiente de la edad. De esta manera, en una realización, dicha formación de aneurisma aórtico puede ocurrir en mamíferos ancianos y de esta manera está relacionado con la edad. En otra realización dicha formación de aneurisma aórtico puede ocurrir debido a una afección genética y/o está relacionada con una enfermedad. Ambas realizaciones pueden ocurrir también simultáneamente.

La expresión "ruptura aórtica" en el contexto de la presente invención se refiere a una afección en la que la aorta, la arteria más grande del cuerpo, se rompe o tiene una ruptura como resultado de la dilatación, en particular como consecuencia de la formación de un aneurisma aórtico, o como resultado de la formación de una placa aterosclerótica.

El término “prevención” en el contexto de la presente invención debe entenderse como una intervención médica que se dirige a evitar la ocurrencia de un evento negativo que más probablemente da lugar al empeoramiento de la afección de un paciente que tiene una enfermedad, o a la lesión o a la muerte de un sujeto sano y/o enfermo.

En una realización el antagonista de la expresión y/o función de ARNmi-29 es para su uso en el aneurisma aórtico (AA), caracterizado por la dilatación localizada de la aorta debido al estrechamiento de la pared vascular.

Por lo tanto, en otra realización, el antagonista de acuerdo con la invención es para su uso en la prevención y/o el tratamiento de aneurisma aórtico relacionado con la edad, en el que dicho aneurisma aórtico - preferentemente relacionado con la edad - implica además una regulación negativa de los genes para las proteínas de la matriz extracelular, tales como, por ejemplo, para colágenos, fibrilina o elastina, en el tejido aórtico, tales como COL1 A1, COL1 A2, COL1 A3, ELN y/o FBN1.

Aún, en una realización adicional de la invención un agonista para la expresión y/o la función de ARNmi-29 se selecciona de ARNmi-29a, ARNmi-29b y ARNmi-29c, en particular un antagonista de la expresión y/o la función de ARNmi-29b.

Los antagonistas de acuerdo con la presente invención son en una realización adicional antagonistas seleccionados de oligonucleótidos de ADN y/o ARN antisentido, 2'-O-metil oligorribonucleótidos antisentido, oligonucleótidos antisentido que contienen enlaces fosforotioato, oligonucleótidos antisentido que contienen bases de “Locked Nucleic Acid LNA®”, oligos antisentido morfolino, agonistas PPAR-gamma, antagonists y mezclas de los mismos.

Ya que los ARNmi marcan como diana su ARNm por apareamiento de bases de Watson y Crick, se prefiere que el Antagonista de ARNmi-29 sea un oligonucleótido antisentido, que sea complementario al ARNmi y con apareamiento de bases con el ARNmi en competición con el ARNm diana endógeno. Para el fin de la invención la secuencia del oligonucleótido antisentido es un 50 % idéntica al complemento del ARNmi-29 (a-c) y/o su secuencia semilla, preferentemente un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 % o un 95 % y más preferentemente un 100 % idéntica al complemento del ARNmi-29 (a-c) y/o su secuencia semilla. Además, se prefieren particularmente los oligonucleótidos antisentido que están químicamente modificados para mejorar la estabilidad térmica del dúplex entre el oligonucleótido antisentido y el ARNmi. Las modificaciones químicas preferidas comprenden, por ejemplo, análogos bicíclicos de ARN de alta afinidad en que el anillo furanosa en el esqueleto de azúcar-fosfato está químicamente encerrado en un imitador de ARN de conformación de tipo N por la introducción de un puente 2'-O,4'-C-metileno (LNA®-antimiR). Otros oligonucleótidos químicamente modificados preferidos incluyen morfolinos, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietil oligonucleótidos y oligonucleótidos 2'-O-metil modificados conjugados a colesterol (antagomirs).

Los antagonistas en el contexto de la invención también comprenden cualquier sustancia que sea capaz de inhibir el ARNmi-29 bien inhibiendo la expresión o bien inhibiendo la función silenciadora del microARN. De esta manera, cualquier compuesto que interfiera con la ruta de microARN, por ejemplo inhibiendo la función de las proteínas de las familias Pasha, Drosha, Dicer o Argonaut puede ser un antagonista de acuerdo con la invención. Adicionalmente cualquier compuesto que inhiba la expresión del microARN precursor de ARNmi-29, tales como, por ejemplo, inhibidores de la polimerasa II o III son antagonistas candidatos de la expresión de ARNmi-29. El ARNmi maduro también sirve como una diana para el diseño de inhibidores de la función del ARNmi-29. Los ácidos nucleicos que tienen complementariedad perfecta o coincidente con el microARN pueden usarse para inhibir, o para competir con la formación de puentes del ARNmi-29 endógeno con su ARNm diana. Cómo diseñar dichos inhibidores de ARNmi se conoce bien en la técnica.

En una realización adicional los antagonistas de la invención se administran al tejido arterial mediante una endoprótesis vascular eluyente de fármacos o mediante un balón. Preferentemente la endoprótesis vascular eluyente de fármacos o el balón se fabrican con un material bioabsorbible. Se entiende que cualquier dispositivo adecuado para la administración local de fármacos en el interior de un vaso sanguíneo puede usarse en el contexto de la presente invención.

En otro aspecto de la presente invención el problema anterior se soluciona por una composición farmacéutica que comprende un antagonista de ARNmi-29, en particular ARNmi-29a a c. En una realización preferida la composición farmacéutica de la invención comprende un antagonista de ARNmi-29 seleccionado de oligonucleótidos de ADN y/o ARN antisentido, 2'-O-metil oligorribonucleótidos antisentido, oligonucleótidos antisentido que contienen enlaces fosforotioato, oligonucleótidos antisentido que contienen bases de “Locked Nucleic Acid LNA®”, oligos antisentido morfolino, agonistas PPAR-gamma, antagonists y mezclas de los mismos y en particular un antagomir de ARNmi-29a a c. En una realización particular preferida el antagonista de ARNmi-29a a c comprende una secuencia que es complementaria a la secuencia madura de ARNmi-29a, ARNmi-29b, ARNmi-29c o combinaciones de las mismas.

Aunque es posible que, para su uso en terapia, pueda administrarse un antagonista de la función y/o la expresión de ARNmi-29a-c como el químico en bruto, es preferible presentar el principio activo como una composición farmacéutica. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un antagonista de la función y/o la expresión de ARNmi-29a-c o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo en asociación con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. El vehículo y/o el excipiente debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no

deletéreo al receptor de la misma.

En todavía otro aspecto, el objeto de la invención se resuelve por un procedimiento de prevención y/o tratamiento de la formación de aneurisma aórtico en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende las etapas de:

- (a) identificar un sujeto que tenga una formación de aneurisma aórtico; y
- (b) administrar a dicho sujeto un antagonista de la expresión o la función de ARNmi-29.

Un sujeto en necesidad de prevención y/o tratamiento de formación de aneurisma aórtico es en el contexto de la presente invención preferentemente un mamífero, más preferentemente un humano, que está diagnosticado que tiene un aneurisma en la aorta. Comprende además un sujeto, preferentemente un mamífero, más preferentemente un humano, que tiene un riesgo aumentado de desarrollar un aneurisma aórtico.

- En una realización se prefiere un procedimiento como se desvela en el presente documento, en el que el antagonista de ARNmi-29 se selecciona de oligonucleótidos de ADN y/o ARN antisentido, 2'-O-metil oligorribonucleótidos antisentido, oligonucleótidos antisentido que contienen enlaces fosforotioato, oligonucleótidos antisentido que contienen bases de "Locked Nucleic Acid LNA®", oligos antisentido morfolino, agonistas PPAR-gamma, antagomirs y mezclas de los mismos y en particular un antagomir de ARNmi-29a a c. En una realización particular preferida el antagonista de ARNmi-29 a a c comprende una secuencia que es complementaria a la secuencia madura de ARNmi-29a, ARNmi-29b, ARNmi-29c o combinaciones de las mismas.

- En una siguiente realización se prefiere un procedimiento de prevención y/o de tratamiento de una formación de aneurisma aórtico en un sujeto en necesidad del mismo, en el que el antagonista de ARNmi-29 se administra por administración parenteral o inyección directa en el tejido arterial. Dicha administración de antagonistas comprende preferentemente administración oral, transdérmica, de liberación sostenida, de liberación retardada, en supositorios, por catéter, endoprótesis vascular de elución de fármaco, o sublingual.

- En una realización adicional el procedimiento de prevención y/o de tratamiento de la formación de aneurisma aórtico de acuerdo con la invención, comprende administrar a dicho sujeto una segunda terapia. Preferentemente dicha segunda terapia se selecciona del grupo que consiste en la introducción de una endoprótesis vascular o un balón. Lo más preferido es que dicha segunda terapia se administre al mismo tiempo que el antagonista de ARNmi-29 o en el que dicha segunda terapia se administra bien antes o bien después del antagonista de ARNmi-29.

- Se prefiere una realización adicional del procedimiento de prevención y/o tratamiento de la formación de aneurisma aórtico relacionado con la edad de acuerdo con la invención, en el que uno o más síntomas de adelgazamiento de la pared vascular y/o la formación disminuida o la destrucción de las proteínas de la matriz extracelular se mejora en el sujeto después de la administración del antagonista de ARNmi-29.

Las siguientes figuras y ejemplos sirven meramente para ilustrar la invención y no deben construirse para restringir el ámbito de la invención descrita en los ejemplos.

Los Ejemplos de la invención se refieren a las Figuras, en las que:

- La Figura 1 muestra un análisis bioinformático de ARNmi y la expresión de ARNm para identificar ARNmi que marquen como diana la Expresión de ARNm. (A) Gráfica apaisada de Sylamer usando palabras de una longitud de 6 nucleótidos. Las "palabras" con los picos más altos reflejan la secuencia semilla del ARNmi-29. (B) Histograma de las puntuaciones del ARNmi. Las puntuaciones fueron como sigue.

Mir	puntuación	p-valor
mmu-miR-29c	26,84	2,2e-12
mmu-miR-29b	26,11	4,5e-12
mmu-miR-29a	23,95	3,9e-11
mmu-miR-186	13,42	1,4e-06
mmu-miR-758	10,75	2,1e-05
mmu-miR-183	10,1	4,0e-05
mmu-miR-182	9,84	5,3e-05
mmu-miR-140	9,55	7,0e-05
mmu-miR-190	9,45	7,8e-05
mmu-miR-98	8,13	0,00029

- La Figura 2 muestra una conformación de ARNmi regulados por la edad en la aorta. Los ARNmi se detectaron por RT-PCR TaqMan en ratones n=4 jóvenes (6 semanas) y n=4 viejos (18 meses). (**) indica una diferencia significativa entre los ratones viejos y los jóvenes.

La Figura 3 muestra la expresión de genes diana ARNmi-29 en aumento en número de veces o disminución en número de veces en aorta envejecida frente a joven.

La Figura 4 muestra la expresión de los miembros de la familia de ARNmi-29 en la aorta de ratones infundidos con

Ang II normalizados frente a sno202. (a) ARNmi-29b, ARNmi-29a, (c) ARNmi-29c. n=6 por grupo. (**) indica una diferencia significativa entre las muestras control y tratadas con angiotensina.

La Figura 5 muestra la expresión de MiR-29 (cambio en número de veces) en SMC tratados con Ang II. (A) ARNmi-29b, (b) ARNmi-29a.

- 5 La Figura 6 muestra la expresión relativa en cambio en número de veces de ARNmi-29a, ARNmi-29b y ARNmi-29c en secciones de tejido de aneurismas aórticos humanos, bien de pacientes con válvulas aórticas tricúspide normales o bien de pacientes con válvulas aórticas bicúspide anormales, en comparación con una aorta control. (**) indica una diferencia significativa de expresión.

Ejemplo 1: regulación relacionada con la edad de ARNmi en la aorta

- 10 Para determinar el efecto de la edad en la expresión de ARNmi, los inventores generaron perfiles de expresión de micromatrices de ARNmi y ARNm comparando ratones macho envejecidos (18 meses de edad) con ratones macho jóvenes (6 semanas de edad). Se identificaron 20 ARNmi que están regulados por la edad [aumento/disminución en número de veces >1,5 y $p < 0,1$] en la aorta por este enfoque (Tabla 1).

- 15 Para establecer cuál de estos ARNmi también ejerce un papel biológico en el envejecimiento, se aplicaron dos herramientas bioinformáticas imparciales distintas que usan datos de expresión de ARNm para identificar la regulación putativa por ARNmi. Ambas de estas herramientas, Sylamer (van Dongen S y col., Detecting microRNA binding and siRNA off-target effects from expression data. Nat Meth. 2008;5:1023-1025) y MirExTra (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/hexamers>), identificaron la familia mir-29 (mir-29a, b y c) como la única de los 20 ARNmi regulados que afecta funcionalmente a los niveles de ARNm (Figura 1). La regulación positiva de la familia
- 20 mir-29 (ARNmi-29a y ARNmi-29b) por edad se confirmó por PCR a tiempo real (Figura 2). En el corazón, la familia ARNmi-29 (que comprende ARNmi-29a, ARNmi-29b y ARNmi-29c) ha demostrado controlar la fibrosis tisular después del infarto de miocardio agudo marcando como diana proteínas de la matriz extracelular tales como colágenos, fibrilina y elastina (van Rooij E y col., Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miRNA-29 in cardiac fibrosis. PNAS. 2008;105:13027-13032). De hecho, todas estas dianas conocidas de
- 25 mir-29 estaban reguladas negativamente por la edad en la aorta (Figura 3).

Tabla 1: ARNmi regulados positivamente y regulados negativamente

ARNmi regulados positivamente		
Nombre del gen	Número de veces	FDR-p
mmu-miR-129-3p	5,45	0,00002
mmu-miR-129-5p	5,37	0,00004
mmu-miR-146a	2,02	0,00671
mmu-miR-142-3p	1,63	0,00599
mmu-miR-29b	1,61	0,00381
mmu-miR-223	1,58	0,00649
ARNmi regulados negativamente		
Nombre del gen	Número de veces	FDR-p
mmu-miR-299*	-2,21	0,00032
mmu-miR-181c	-2,14	0,00028
mmu-miR-127	-2,10	0,00013
mmu-miR-154	-1,95	0,00145
mmu-miR-337-5p	-1,86	0,00163
mmu-miR-379	-1,76	0,00150
mmu-miR-136	-1,71	0,00244
mmu-miR-329	-1,70	0,00017
mmu-miR-31	-1,67	0,00246
mmu-miR-322	-1,67	0,00675
mmu-miR-377	-1,63	0,00359
mmu-miR-434-3p	-1,61	0,00325
mmu-miR-411	-1,54	0,00052
mmu-miR-181d	-1,51	0,00237

Ejemplo 2: La Angiotensina II induce la expresión de ARNmi-29 *in vitro* e *in vivo*

La infusión de angiotensina (Ang) II en ratones ApoE^{-/-} se usa como un modelo establecido para la formación de AA en ratones. Por lo tanto, se aplicó continuamente Ang II en ratones durante 4 semanas. En la aorta de ratones tratados con Ang II, el ARNmi-29b se reguló positivamente de forma significativa (Figura 4a). Sin embargo, el otro miembro de la familia ARNmi-29, ARNmi-29a, no se reguló (Figura 4b). Estos datos *in vivo* se confirmaron por estudios *in vitro* que muestran que el tratamiento con Ang II de las células de músculo liso estimuló la expresión de ARNmi-29b pero no afectó a ARNmi-29a (Figura 5). Estos datos demuestran que Ang II como un inductor prototípico de la formación de AA en ratones induce la expresión de ARNmi-29b.

Ejemplo 3: ARNmi-29b se aumenta específicamente en secciones patológicas de aneurismas humanos

Para ensayar la relevancia de estos descubrimientos experimentales en humanos, se midió la expresión de los miembros de la familia de ARNmi-29 en secciones patológicas de pacientes con enfermedad de válvula aórtica bicúspide. En este ajuste experimental, se aumentó significativamente miR-29b, pero no ARNmi-29a ni ARNmi-29c en secciones de n=77 pacientes en comparación con n=30 aortas control (Figura 6). Sin embargo, sin desear quedar unido a teoría alguna, se asume que en sujetos/pacientes ancianos la regulación de ARNmi-29a y ARNmi-29c también se modifica, como se encontró en los modelos de ratón respectivos.

Los datos del presente estudio muestran que la edad está asociada a una expresión aumentada de la familia ARNmi-29 en la aorta. Consistente con la expresión aumentada de los miembros de la familia ARNmi-29, los niveles de las proteínas de la matriz extracelular que se marcan como diana por ARNmi-29 se reducen significativamente. Ya que la edad comprende un factor de riesgo principal para el desarrollo de AA, los presentes inventores posteriormente determinaron la regulación de ARNmi-29 en aortas de ratones infundidos con Ang II. La Ang II es uno de los factores que aumentan la incidencia de AA en ratones. Como con el envejecimiento, la infusión con Ang II aumenta la expresión de ARNmi-29b. Sin embargo, en contraste con el envejecimiento otros miembros de la familia de ARNmi-29 no se regularon por la infusión con Ang II. De forma similar, el tratamiento con Ang II de SMC *in vitro* también aumentó preferentemente la expresión de ARNmi-29b. Para determinar la relevancia putativa en humanos, los inventores midieron adicionalmente la expresión de los miembros de la familia ARNmi-29 en secciones patológicas humanas. Consistente con los descubrimientos experimentales usando Ang II como estímulo, ARNmi-29b se reguló positivamente de forma selectiva y significativa en secciones enfermas frente a control de la aorta humana. Juntos estos datos demuestran que ARNmi-29b se aumenta por la edad y por factores que estimulan AA en modelos experimentales así como en humanos. Ya que el ARNmi-29b marca como diana proteínas de la matriz extracelular, uno puede especular que la expresión aumentada de ARNmi-29b puede contribuir a la destrucción de la matriz extracelular y el adelgazamiento de la pared del vaso sanguíneo.

Se demostró adicionalmente que MiR-29 induce apoptosis en células cancerígenas marcando como diana Mcl-1, un miembro de la familia Bcl-2 anti-apoptótico (Mott KL y col., mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene*. 2007; 26:6133-6140) y aumenta los niveles de p53 (Park SY y col., miRNA-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 [alpha] and CDC42. *Nat Struct Mol Biol*. 2009; 16:23-29). Se considera que la apoptosis de las células de músculo liso contribuyen a la ruptura de la placa y pueden estar implicados en AA así como (Clarke MCH y col., Chronic Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells Accelerates Atherosclerosis and Promotes Calcification and Medial Degeneration, *Circ Res*. 2008;102:1529-1538). Aunque aún hay que demostrar que estos efectos pro-apoptóticos del ARNmi-29 también ocurren en las células del músculo liso, una inducción de la apoptosis de las células del músculo liso por ARNmi-29 puede dar lugar además a la desestabilización de la placa. De esta manera, el ARNmi-29b puede ser una diana muy atractiva para prevenir el adelgazamiento y la desestabilización de placas ateroscleróticas.

Debido a que la cirugía es el único tratamiento actualmente disponible para el AA, una intervención farmacológica novedosa proporcionará una etapa principal en la terapia de AA. Los inhibidores de ARNmi - denominados antagomirs o antimiRs - se han usado exitosamente para reducir la expresión de ARNmi en modelos de ratón y primates no humanos (Bonauer A y col., MicroRNA-92a Controls Angiogenesis and Functional Recovery of Ischemic Tissues in Mice. *Science*. 2009;324:1710-1713; Lanford y col., Therapeutic Silencing of MicroRNA-122 in Primates with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Science*. 2010;327:198-201). La administración local de antagomirs por endoprótesis vasculares que eluyen fármacos o a través de balones puede ser útil para proporcionar una supresión local eficiente del ARNmi en el tejido diana y limitar los efectos secundarios putativos en otros órganos.

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido antisentido complementario al ARNmi-29 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la formación de aneurisma aórtico en un mamífero.
- 5 2. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho aneurisma aórtico es aneurisma aórtico abdominal (AAA) y/o aneurisma aórtico relacionado con la edad.
3. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha formación de aneurisma aórtico implica además un debilitamiento de los vasos arteriales y/o ruptura aórtica.
- 10 4. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho aneurisma aórtico implica además una regulación negativa de los genes para las proteínas de la matriz extracelular, tales como, por ejemplo, para colágenos, fibrilina o elastina, en el tejido arterial, tales como COL1A1, COL1A2, COL1A3, ELN y/o FBN1.
- 5 6. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho ARNmi-29 es ARNmi-29b.
- 15 7. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho antagonista se selecciona de oligonucleótidos de ADN y/o ARN antisentido, oligorribonucleótidos de 2'-O-metil antisentido, oligonucleótidos antisentido que contienen enlaces fosforotioato, oligonucleótidos antisentido que contienen bases de ácido nucleico bloqueado, oligonucleótidos antisentido morfolino, antagomirs y mezclas de los mismos.
- 20 8. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho oligonucleótido antisentido se administra al tejido arterial mediante una endoprótesis vascular que eluye fármaco o mediante un balón.
- 25 9. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido complementario a ARNmi-29, en particular ARNmi-29a a c, junto con un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la formación de aneurisma aórtico en un mamífero.
- 30 10. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el antagonista de ARNmi-29 se selecciona de oligonucleótidos de ADN y/o ARN antisentido, oligorribonucleótidos de 2'-O-metil antisentido, oligonucleótidos antisentido que contienen enlaces fosforotioato, oligonucleótidos antisentido que contienen bases de ácido nucleico bloqueado, oligos antisentido morfolino, antagomirs y mezclas de los mismos y en particular un antagomir de ARNmi-29a a c.
- 35 11. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en la que el antagonista de ARNmi-29a a c comprende una secuencia que es complementaria a la secuencia madura de ARNmi-29a, ARNmi-29b o ARNmi-29c o combinaciones de las mismas.

Figura 1

A)

Gráfica apaisada de Sylamer usando palabras de longitud: 6

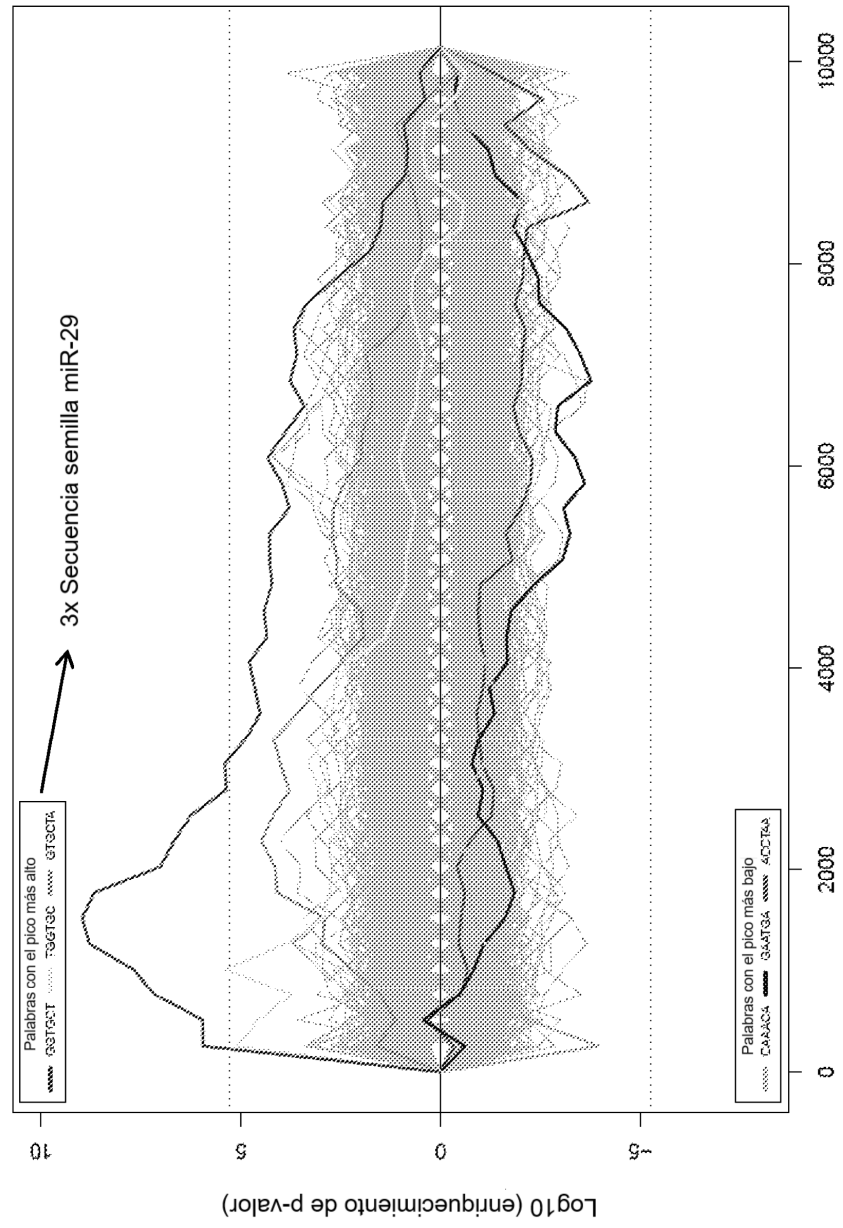


Figura 1 (continuación)

B)

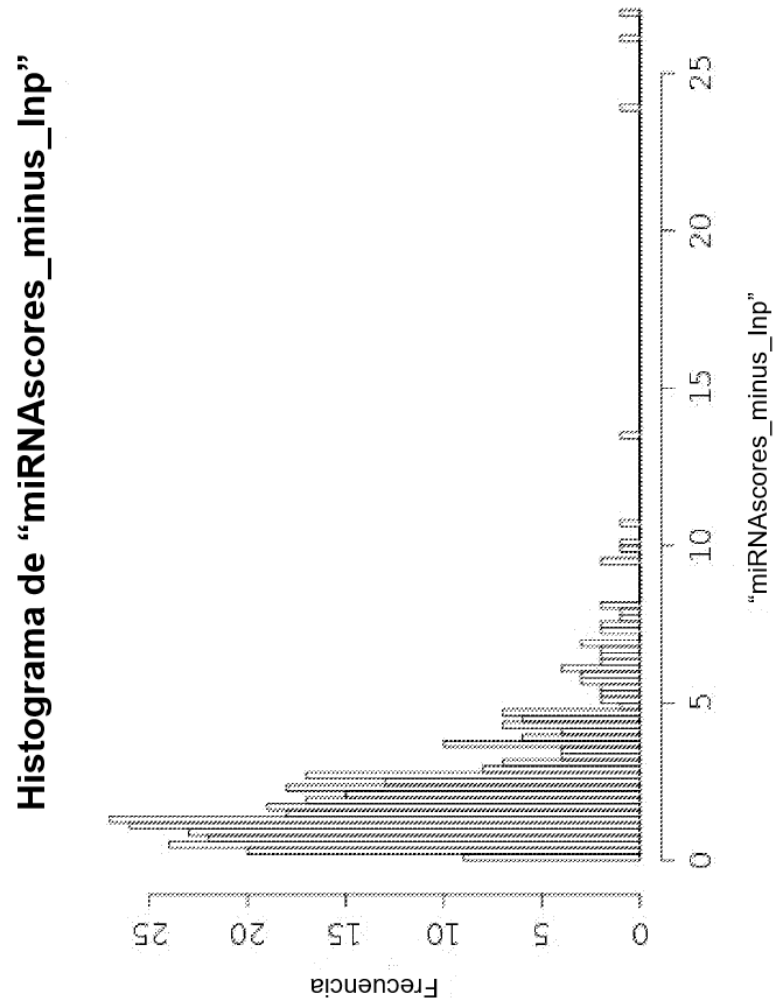


Figura 2

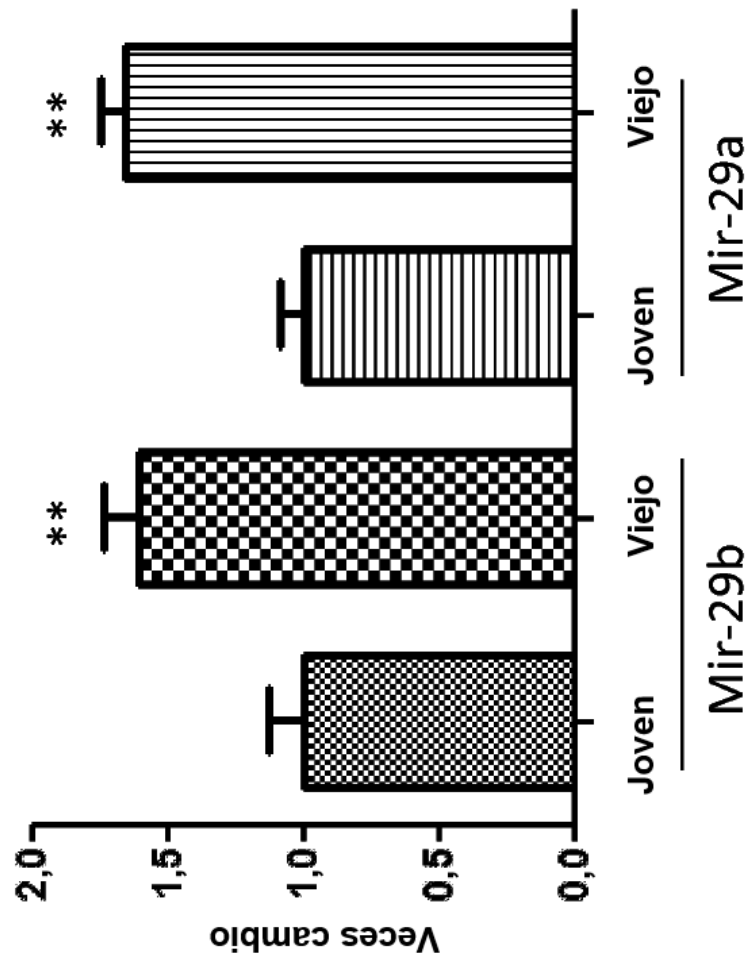
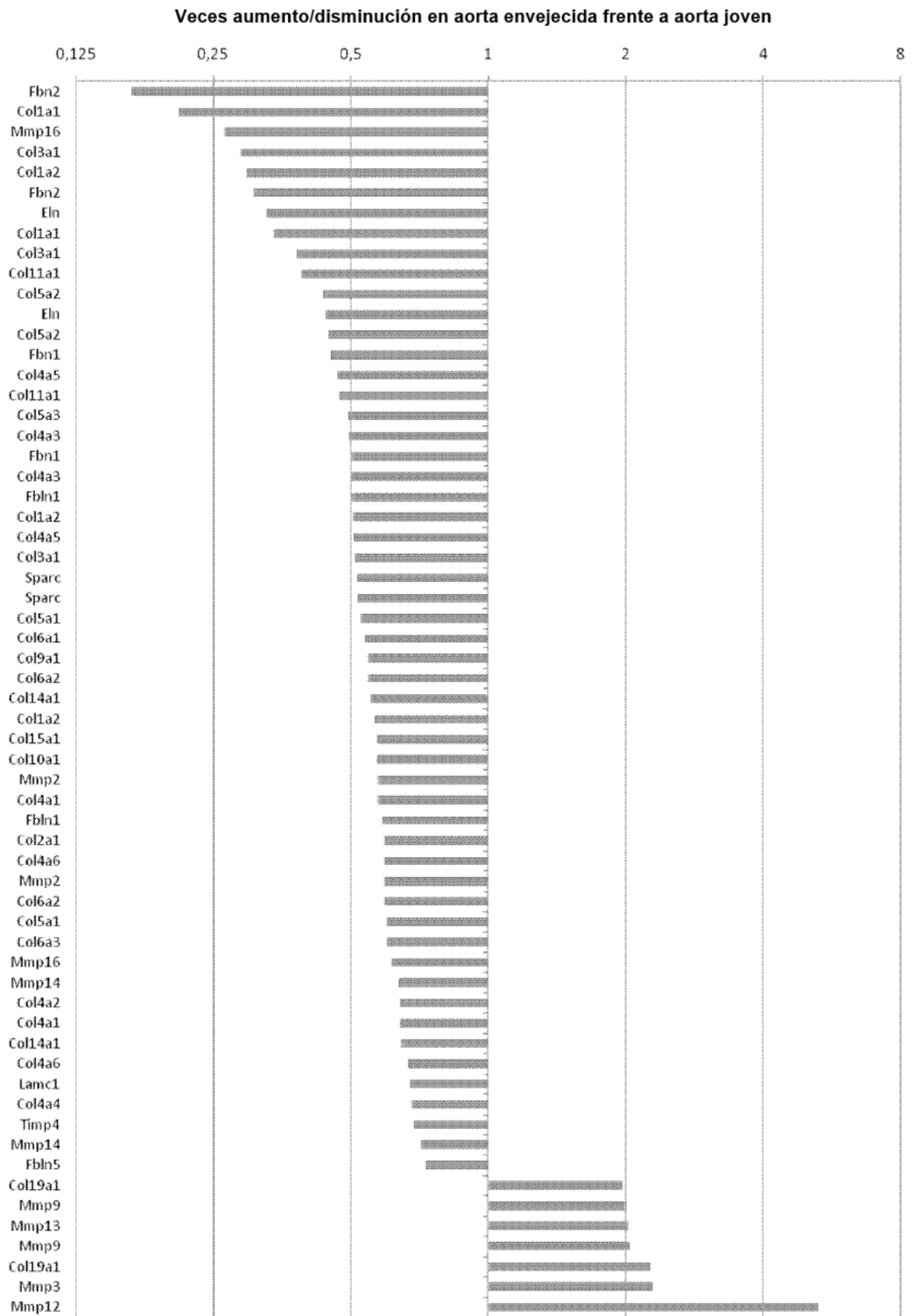


Figura 3



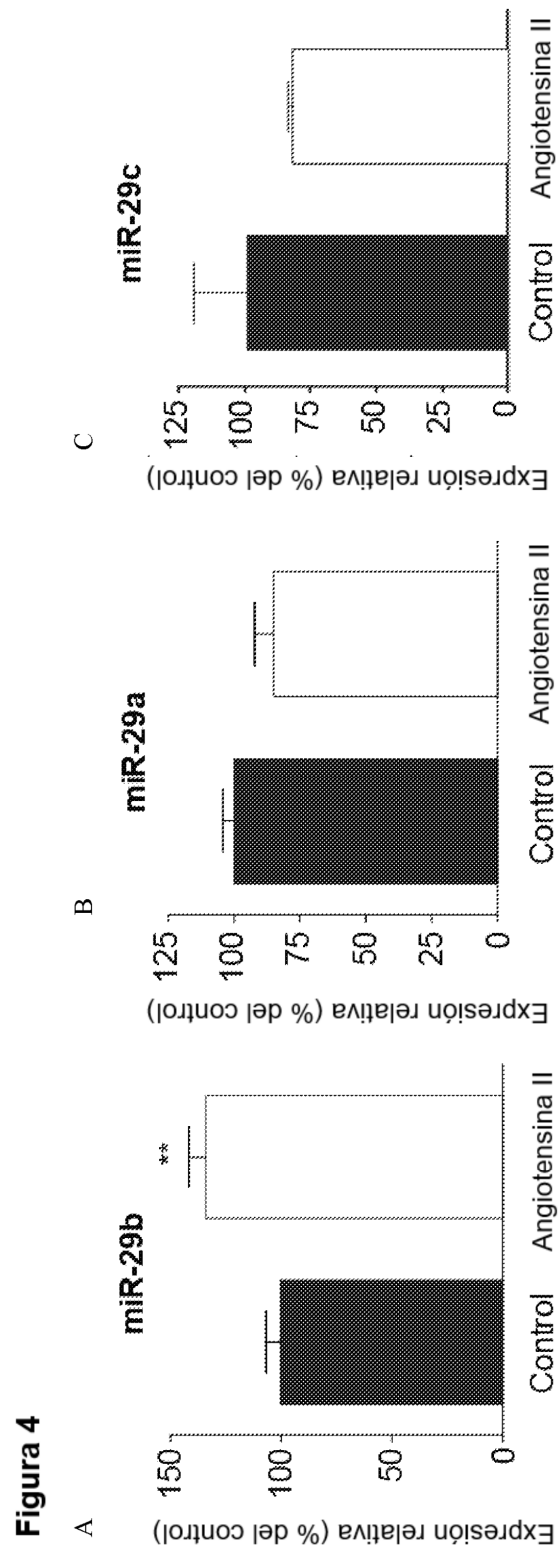
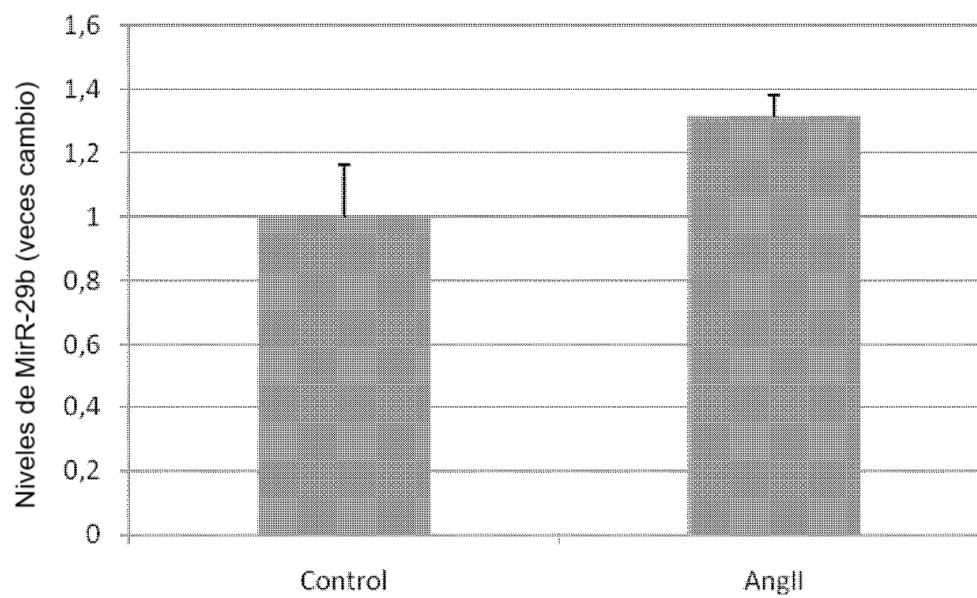


Figura 5

A



B

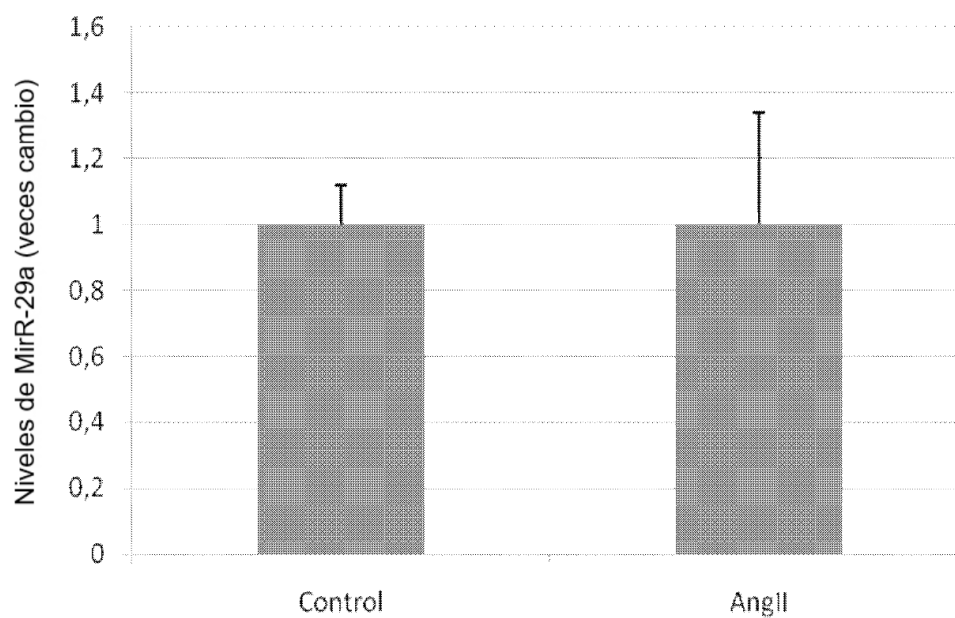


Figura 6

