



(10) **DE 10 2007 052 114 B4 2011.01.05**

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2007 052 114.8**
(22) Anmeldetag: **30.10.2007**
(43) Offenlegungstag: **07.05.2009**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **05.01.2011**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 5/071 (2010.01)**
C12N 5/074 (2010.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
t2cure GmbH, 60325 Frankfurt, DE

(74) Vertreter:
BOEHMERT & BOEHMERT, 28209 Bremen

(72) Erfinder:
Dimmeler, Stefanie, Prof. Dr., 60594 Frankfurt, DE;
Zeihner, Andreas M., Prof. Dr., 60594 Frankfurt, DE;
Bonauer, Angelika, 60316 Frankfurt, DE; Urbich,
Carmen, Dr., 40211 Düsseldorf, DE

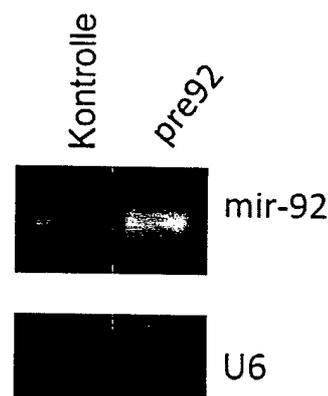
(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

WO 08/0 14 008 A2
WO 05/0 13 901 A2

CAPLUS AN 2005:138839

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Modulation der Funktion, des Wachstums oder der Differenzierung einer Zelle**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Erhöhung des Gefäßwachstums, der Verbesserung der Neovaskularisierung und der Gefäßreparation oder zur Blockade der Tumorangio-genese, aufweisend die folgenden Schritte:
– Bereitstellen einer Zelle; und
– Verringern der miR-92 Expression in der Zelle zur Erhöhung des Gefäßwachstums, der Verbesserung der Neovaskularisierung und der Gefäßreparation, oder
– Erhöhen der miR-92 Expression in der Zelle zur Blockade der Tumorangio-genese,
wobei
– die Verringerung der miR-92 Expression in der Zelle durch Bereitstellung eines antisense Moleküls gegen miR-92 erfolgt, und
– die Erhöhung der miR-92 Expression in der Zelle durch Transfektion der Zelle mit einem Konstrukt erfolgt, das eine exprimierbare miR-92 Sequenz aufweist.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Modulation der Funktion, des Wachstums oder der Differenzierung einer Zelle sowie die Verwendung eines derartigen Verfahrens zur Therapie einer Krankheit oder eines Zustands. Weiterhin betrifft die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Modulation der Funktion, des Wachstums oder der Differenzierung einer Zelle.

[0002] Das Endothelium spielt eine bedeutende Rolle bei der Erhaltung der Integrität und Funktionalität der Gefäße. Das Wachstum neuer Gefäße geschieht im Erwachsenen durch Arteriogenese, Angiogenese oder Vaskulogenese. Während Arteriogenese als das Wachstum kollateraler Gefäße definiert ist, wird unter Angiogenese das Wachstum neuer Blutgefäße aus Vor-existierenden Gefäßen verstanden. Während der Angiogenese werden ruhende Endothelzellen durch angiogene Faktoren aktiviert und beginnen zu migrieren, proliferieren und organisieren sich in tubulären Strukturen (2). Der Begriff Vaskulogenese beschrieb ursprünglich die Denovoblutgefäßbildung im Embryo aus Angioblasten, bezieht sich aber inzwischen auch auf die Bildung von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen oder anderen adulten Stammzellen (1). Angiogenese und Vaskulogenese stellen physiologische Entwicklungsprozesse dar, die in der Wiederherstellung des Blutflusses in ischämischen Geweben eine essentielle Rolle spielen und einen grundlegenden Schritt im Wachstum von Tumoren darstellen. Die Förderung der Angiogenese und Neovaskularisierung wurde beispielsweise in von Ischämien betroffenen Patienten als mögliche therapeutische Strategie identifiziert. In der Tumorangiogenese führt die Eindämmung dieser Prozesse zur Repression des Tumorwachstums.

[0003] MikroRNAs (miRNAs) sind kleine nicht kodierende RNAs, die die Genexpression auf der posttranskriptionalen Ebene durch Degradation der Ziel mRNA oder durch translationale Repression regulieren (3). Im Gegensatz zu kleinen interferierenden RNAs (siRNA), die an komplementäre mRNA Sequenzen binden, findet die Bindung der miRNA an ein Ziel nicht nur an eine komplementäre RNA statt, sondern bildet komplexere RNA-RNA-Strukturen, die thermodynamisch bevorzugt sind (4). Diese „inkomplette“ Bindung erlaubt es, dass ein miRNA Molekül an verschiedene mRNA Moleküle binden kann. Die Regulation eines Sets von Genen (im Gegensatz zur Monotherapie mittels eines Gens oder eines Wachstumsfaktors) kann einen Vorteil darstellen, wenn komplexe regulatorische Prozesse dadurch beeinflusst werden können. Bisher sind mehr als 400 miRNAs im menschlichen Genom identifiziert worden, aber die Relevanz der meisten dieser miRNAs für die zelluläre Funktion in physiologischen und pathologischen Prozessen ist nach wie vor unklar. Während es im Stand der Technik beschrieben wurde, dass die Herunter-Regulation der miRNA-prozessierende Enzyme Dicer und Drosha die Angiogenese beeinträchtigt (5–7), sind nur wenige spezifische miRNAs beschrieben worden, die endotheliale Zellfunktionen und Angiogenese beeinflussen. miR-221 und miR-222 blockieren die endotheliale Zellmigration, Proliferation und Angiogenese in vitro durch Interaktion mit dem Stammzellfaktorrezeptor c-kit und Regulierung der eNOS Expression auf indirekte Weise (6, 8). Im Gegensatz dazu trägt die Expression von letz-f und miR-27b zur in vitro Angiogenese bei (7).

[0004] Im Stand der Technik wurde dem miRNA Cluster miR-17-92 eine starke Tumorangiogenese fördernde Aktivität zugesprochen. Der miR-17-92 Cluster besteht aus miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b und miR-92-1 (9). Dieser miR-17-92 Cluster ist in Myc-induzierten Tumoren hochreguliert und die einzelnen miRNAs miR-17 und miR-18 konnten als Moleküle identifiziert werden, die mit der Expression antiangiogener Proteine spezifisch interagieren. Eine spezifische Evaluierung der Ziele dieser miRNAs zeigte, dass miR-18 bevorzugt die Expression des konvektiven Gewebewachstumsfaktors (CTGF) supprimiert, während miR-19 mit dem starken Angiogenese-Inhibitor Thrombospondin-1 (TSP-1) interagiert. (10).

[0005] WO 2005/013901 A2 beschreibt oligomere Substanzen, insbesondere modifizierte Nukleinsäuren, zur Modulation der Expression oder Funktion kleiner, nicht-kodierender RNAs, beispielsweise Mikro-RNAs. Die Modulation erfolgt dabei über komplementäre Bindung der beschriebenen Nukleinsäuren an die Ziel-RNA, wodurch letztere sterisch gehindert wird ihre Funktion auszuführen, oder aber Ziel endogener Abbauenzyme wird.

[0006] Die WO 2008/014008 A2 befaßt sich ebenfalls mit inhibitorischen Nukleinsäure Molekülen. Ziel der in dieser WO beschriebenen Erfindung war es die Funktion oder Expression von regulatorischen Mikro-RNAs zu modulieren, die eine Rolle bei der Steuerung in der Angiogenese spielen. Im Fokus der Offenbarung ist insbesondere der Mikro-RNA Cluster um mir-17-92, der angeblich eine stark angiogene Funktion besitzen soll.

[0007] Überraschenderweise wurde erfindungsgemäß gefunden, dass miR-92 nicht, wie im Stand der Technik beschrieben, die Angiogenese fördert, sondern die Migration und Tubusformierung endothelialer Zellen in vitro und die Neovaskularisierung in vivo stark vermindert. Die Inhibierung von miR-92 erhöht die Neovaskularisierung. Demzufolge besitzt miR-92 antiangiogene Aktivität. Diese antiangiogene Aktivität steht im Zusam-

menhang mit der Inhibierung von Schlüsselproteinen, die Angiogenese und endotheliale Aktivität kontrollieren, einschließlich der endothelialen Stickoxidsynthase (eNOS) und Sirtuin1 (SIRT1), die beide für postnatale endotheliale Zellfunktionen essentiell sind (11 bis 13), und Integrin $\alpha 5$, das die endotheliale Zellmotilität und die Interaktion mit der Matrix kontrolliert (14). Die Inhibierung von miR-92 durch miR-92 Inhibitoren stellt eine neue therapeutische Strategie zur Verbesserung der endothelialen Zellfunktion und der Neovaskularisierung dar. Gleichzeitig wurde gefunden, dass die Überexpression von miR-92 Neovaskularisierung vermindert.

Zusammenfassung der Erfindung

[0008] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erhöhung des Gefäßwachstums, der Verbesserung der Neovaskularisierung und der Gefäßreparation oder zur Blockade der Tumorangiogenese. Erfindungsgemäß weist das Verfahren die folgenden Schritte auf:

- Bereitstellen einer Zelle; und Verringern der miR-92 Expression in der Zelle zur Erhöhung des Gefäßwachstums, der Verbesserung der Neovaskularisierung und der Gefäßreparation, oder
- Erhöhen der miR-92 Expression in der Zelle zur Blockade der Tumorangiogenese, wobei
- die Verringerung der miR-92 Expression in der Zelle durch Bereitstellung eines antisense Moleküls gegen miR-92 erfolgt, und
- die Erhöhung der miR-92 Expression in der Zelle durch Transfektion der Zelle mit einem Konstrukt erfolgt, das eine exprimierbare miR-92 Sequenz aufweist.

[0009] Unter den Begriff miR-92 fallen sowohl Vorläufermoleküle wie pre-92a-1, pre-92a-2 und pre-92b, als auch prozessierte Moleküle wie miR-92a, und miR-92b.

[0010] Verfahren zur Messung der Stärke der Expression sind dem Fachmann bekannt. Hier kommen beispielsweise Real-time PCR in Frage. Die jeweilige Änderung der Expression kann auch über die funktionalen Auswirkungen auf die Eigenschaften der Zelle bestimmt werden.

[0011] Nach der vorliegenden Beschreibung erfolgt die Modulation der Funktion, des Wachstums oder der Differenzierung der Zelle durch Beeinflussung der Expression eines Proteins, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus: eNOS, SIRT1, Integrin alpha 5, Integrin beta 1, Integrin alpha v, Sprouty 2, TIMP 4, Tie 2, ANG 2, MKK 4, KLF 2, PCAF, EDG 1 und RAP 1B in der Zelle. Alle diese Proteine sind assoziiert mit der Kontrolle der endothelialen Zellfunktion, der Arteroprotektion und/oder der postnatalen Neovaskularisierung. SIRT 1 ist zudem mit altersbedingten Erkrankungen assoziiert.

[0012] Das Bereitstellen einer Zelle umfasst das Bereitstellen sowohl eine Zelle in isolierter Form, wie beispielsweise einer Zelle einer klonalen Zelllinie, als auch das Bereitstellen einer Zelle, die Teil eines Gewebes, Organs oder eines Organismus ist.

[0013] Die bereitgestellte Zelle kann grundsätzlich jede Art von Zelle umfassen. Bevorzugter Weise ist die bereitgestellte Zelle eine vaskuläre Zelle, eine hämatopoetische Zelle, eine Herzmuskelzelle, eine inflammatorische Zelle und/oder eine neuronale Zelle. Dies schließt jeweils sämtliche Vorläufer- und Stammzellen der genannten Zellen ein.

[0014] Die bereitgestellte Zelle stammt bevorzugt von einem Metazoen, insbesondere von einem Säugetier (etwa einem Nagetier wie Maus oder Ratte), einem Affen, Menschenaffen, einem Rind, einem Schwein, einem Hund oder einer Katze oder, besonders bevorzugt, von einem Menschen.

[0015] Wie nachfolgend näher erläutert werden wird, umfasst der Begriff „Modulation“ der Funktion, des Wachstums oder der Differenzierung sowohl die Erhöhung als auch die Verringerung des Wachstums oder der Differenzierung einer Zelle.

[0016] Sofern es sich bei der Modulation um eine Erhöhung des Wachstums oder der Differenzierung einer Zelle, wie einer Endothelzelle handelt, ist die Beeinflussung der Expression eine Verringerung der miR-92 Expression in der Zelle gegenüber der normalen Expression von miR-92 in einer Wildtyp Zelle vermindert. Erfindungsgemäß erfolgt die Verminderung der Expression durch Bereitstellung eines Moleküls, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einem antisense Moleküle, einem synthetischen miR-92 Inhibitor und einem Transkriptionsfaktorinhibitor. Diese Verringerung der miR-92 Expression hat eine Verstärkung der Vaskularisierung im Gewebe zur Folge.

[0017] Gemäß der Beschreibung ist das antisense Molekül ein Molekül, dass mit einem RNA-Molekül gemäß einer der SEQ ID NO 1 bis 5 hybridisiert. Dies schließt die Möglichkeit mit ein, dass das antisense Molekül im hybridisierten Zustand gegenüber der miR-92 mismatches aufweist, die jedoch die Funktion als antisense Molekül nicht aufheben. Es kommt somit trotz Basenfehlpaarung(en) zur Inhibition oder zum Abbau der miR-92. Insbesondere kann das antisense Molekül eine Länge von 15 bis 22 Nukleotide aufweist. Zur Inhibition der unreifen miR-92 Vorläufer kann das antisense Molekül auch bis zu 30 Nukleotide aufweisen.

[0018] In einer bevorzugten Ausführungsform weist das antisense Molekül eine Sequenz auf, die zu einer Sequenz gemäß einer der SEQ ID NO 1 bis 5 komplementär ist. Dadurch kommt es nicht zur Ausbildung von Basenfehlpaarung(en), was eine effiziente Inhibierung der miR-92 zur Folge hat. In einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung ist das antisense Molekül ein Molekül gemäß SEQ ID NO 6.

[0019] Ein Verfahren der eben beschriebenen Art kann zur Therapie einer Krankheit oder eines Zustands eingesetzt werden. Die Krankheit oder der (ggf. pathologische) Zustands, ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ischämie (wie Myokardinfarkt, chronischer ischämischer Herzkrankheit, periphere Herzarterienokklusion, ischämischem Infarkt, Schlaganfall), pathologischer Angiogenese (wie Tumorangio-genese, Metastasenbildung, diabetische Retinopathie, chronischen Entzündungskrankheiten), Artherosklerose, Folgeerkrankungen der Artherosklerose (Akutes Koronarsyndrom, Myokard-Infarkt, Schlaganfall, Kardiomyopathie) oder (vorzeitiger) Alterung oder alterungsassoziierte Erkrankungen, sowie neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson.

[0020] Gleichfalls kann das beschriebene Verfahren zur Behandlung von Stammzellen oder Vorläuferzellen (pro-angiogenen Zellen, organ-spezifischen Vorläuferzellen, aus dem Knochenmark abgeleiteten Zellen oder zirkulierenden Vorläuferzellen) eingesetzt werden.

[0021] Somit kann das Verfahren sowohl in vivo, als auch ex vivo oder in vitro eingesetzt werden, etwa zur Herstellung von Gefäßersatzmaterial, insbesondere für die Gewebeersatztherapie, oder in der Forschung.

[0022] Sofern es sich demgegenüber bei der Modulation um eine Verringerung des Wachstums oder der Differenzierung einer Zelle, wie einer Endothelzellen handelt, ist die Expression der miR-92 in der (Endothel-)Zelle gegenüber der normalen Expression von miR-92 in einer Wildtyp Zelle erhöht. Dies kann beispielsweise durch die Erhöhung der Expression mittels Transfektion der Zelle mit einem Konstrukt, dass eine exprimierbare miR-92 Sequenz aufweist, erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens hat das exprimierbare miR-92 Konstrukt eine Sequenz gemäß einer der SEQ ID NO 1 bis 5 bzw. kann eine derartige Sequenz exprimieren.

[0023] Ein Verfahren der zuletzt beschriebenen Art kann zur Therapie einer Krankheit oder eines (pathologischen) Zustands eingesetzt werden, der ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus überschießender Angiogenese, unerwünschter Angiogenese, Tumoren und chronischen Entzündungen.

[0024] Die Erfindung betrifft weiterhin eine pharmazeutische Zusammensetzung, aufweisend ein Mittel zur Modulation der Funktion, des Wachstums oder der Differenzierung einer Zelle, wobei das Mittel eine Erhöhung oder eine Verringerung der miR-92 Expression oder Aktivität in der Zelle bewirkt. In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform ist das Mittel zur Verringerung der miR-92 Expression in einer Zelle ein antisense Molekül.

[0025] In einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform ist das Mittel ein Mittel zur Erhöhung der miR-92 Expression in der Zelle eine Konstrukt zur Expression von miR-92, etwa ein Plasmid oder eine Vorläufer miRNA. Dabei ist es bevorzugt, wenn das Konstrukt eine exprimierbare Sequenz gemäß einem der SEQ ID NO 1 bis 5 aufweist.

[0026] Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der oben beschriebenen pharmazeutischen Zusammensetzungen.

[0027] Die pharmazeutische Zusammensetzung können in Form von Tabletten, Dragees, Pillen, Granulaten, Aerosolen, Infusionslösungen, Emulsionen, Suspensionen, Lösungen bzw. in oder auf dem Beschichtungsmaterial eines Stents vorliegen.

[0028] Die Verwendung der Mittel bzw. der pharmazeutischen Zusammensetzung kann durch geeignete bekannte Formulierungen geschehen.

[0029] Die Verwendung der Mittel kann in bekannter Weise in die üblichen Formulierungen überführt werden, wie Tabletten, Dragees, Pillen, Granulate, Aerosole, Emulsionen, Suspensionen und Lösungen, unter Verwendung inerter, nicht toxischer, pharmazeutisch geeigneter Trägerstoffe oder Lösungsmittel. Hierbei soll die therapeutisch wirksame Mittelkonzentration in Bezug auf die therapeutisch wirksame Verbindungen jeweils in einer Konzentration von etwa 0,1 Gew.-% bis 95 Gew.-%, bevorzugt von etwa 0,5 Gew.-% bis 90 Gew.-% der Gesamtmischung vorhanden sein, d. h. in Mengen, die ausreichend sind, um die erforderlichen Wirkstoffkonzentrationen im Zielgewebe zu erreichen.

[0030] Die Formulierungen werden beispielsweise hergestellt durch Verstrecken der Mittel mit Lösungsmitteln und/oder Trägerstoffen, gegebenenfalls unter Verwendung von Emulgiermitteln und/oder Dispergiermitteln, wobei z. B. im Fall der Benutzung von Wasser als Verdünnungsmittel gegebenenfalls organische Lösungsmittel als Hilfsstoffe verwendet werden können.

[0031] Als Hilfsstoffe erwähnt seien z. B. Wasser, nicht-toxische Lösungsmittel wie Parafin (z. B. Erdölfraktionen), pflanzliche Öle (z. B. Erdnuß-, Sesamöl), Alkohole (z. B. Ethylalkohol, Glycerin), Trägerstoffe, wie natürliche Gesteinsmehle (z. B. Kaoline, Tonerde, Talkum, Kreide), synthetische Gesteinsmehle (z. B. hochdisperse Kieselsäure, Silikate), Zucker (z. B. Rohr-, Milch- und Traubenzucker), Emulgiermittel (z. B. Polyoxyethylen-Fettsäure-Ester, Polyoxyethylen-Fettalkohol-Ether), Dispergiermittel (z. B. Lignin, Sulfitablaugen, Methylcellulose, Stärke und Polyvinylpyrrolidon) und Gleitmittel (z. B. Magnesiumstearat, Talkum, Stearinsäure und Natriumsulfat).

[0032] Die Applikation erfolgt in üblicher Weise, bevorzugt oral oder parenteral, insbesondere perlingual oder intravenös. Im Falle der oralen Anwendung der erfindungsgemäßen Medikamente können Tabletten selbstverständlich außer den genannten Trägerstoffen auch Zusätze, wie Natriumcitrat, Calciumcarbonat und Dicalciumphosphat zusammen mit verschiedenen Zuschlagstoffen, wie Stärke, vorzugsweise Kartoffelstärke, Gelatine, und dergleichen enthalten. Weiterhin können Gleitmittel, wie Magnesiumstearat, Natriumlaurylsulfat und Talkum zum Tablettieren mit verwendet werden. Im Falle wässriger Suspensionen können die Wirkstoffe außer den oben genannten Hilfsstoffen mit verschiedenen Geschmacksaufbesserern oder Farbstoffen versetzt werden. Für den Fall der parenteralen Anwendung können Lösungen der Wirkstoffe unter Verwendung geeigneter flüssiger Trägermaterialien eingesetzt werden.

[0033] Die Offenbarung betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Therapie oder Prophylaxe eines Individuums, insbesondere eines Patienten, unter Verwendung eines miR-92 oder eines miR-92 Antagonisten (etwa eines antisense Moleküls oder eines Transkriptionsfaktorinhibitors) oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß der obigen Beschreibung.

[0034] Die Offenbarung betrifft auch ein Molekül aufweisend eine Sequenz, die mit einem Molekül einer Sequenz gemäß SEQ ID NO 1 bis 5 hybridisiert, wobei das Molekül 15 bis 22 Basen aufweist. Das Molekül kann ein antisense Molekül gegen ein miR-92 Molekül sein und kann ggf. Modifikationen aufweisen. Als Modifikationen kommen beispielsweise Cholesterol-Konjugationen in Frage. Bevorzugt ist auch ein Molekül gemäß SEQ ID NO 6.

[0035] Ein derartiges Molekül kann zur Modulation des Wachstums oder der Differenzierung einer Zelle verwendet werden.

[0036] MiR-92 kann erfindungsgemäß zur Herstellung einer oben beschriebenen pharmazeutischen Zusammensetzung verwendet werden.

[0037] Insbesondere in einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung keine Verfahren zum Klonen von menschlichen Lebewesen oder Verfahren zur Veränderung der genetischen Identität der Keimbahn des menschlichen Lebewesens, sowie nicht die Verwendung von menschlichen Embryonen zu industriellen oder kommerziellen Zwecken oder Verfahren zur Veränderung der genetischen Identität von Tieren, die geeignet sind, Leiden dieser Tiere ohne wesentlichen medizinischen Nutzen für den Menschen oder das Tier zu verursachen, sowie die mit Hilfe solcher Verfahren erzeugten Tiere.

[0038] Die Erfindung wird anhand von Beispielen näher erläutert, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein. Die Ergebnisse der in den Beispielen beschriebenen Versuche sind in den Figuren dargestellt.

Figuren

[0039] Es zeigen:

[0040] **Fig. 1:** Effekte der Überexpression von miR-92 auf in vitro Funktionen von Endothelzellen.

(A) Überexpression von miR-92 in prä-miR-92 transfizierten Endothelzellen.

(B/C) Inhibierung der Sprossenbildung in einem Sphäroid (B) und einem „Matrigel Assay“ (C).

(D/E/F) Effekt von prä-miR-92 auf die Viabilität (D) Migration (E) und Adhäsion (F).

[0041] **Fig. 2:** Den Effekt der Überexpression von miR-92 auf die in vivo Angiogenese.

(A) Überexpression von miR-92 in prä-miR-92 transfizierte Endothelzellen.

(B/C/D) Inhibierung der Angiogenese in vivo. HUVEC wurden mit einer Kontrolle oder mit prä-miR-92 transfiziert und 1×10^6 Zellen wurden in vivo „Matrigel Plugs“ implantiert. Die Angiogenese wurde in H&E-Schnitten

(B/C) bestimmt und die Perfusion wurde durch Messung des Hämoglobins bestimmt (D).

[0042] **Fig. 3:** Den Effekt der miR-92 Inhibierung auf die in vitro und in vivo Angiogenese.

(A) Stimulierung der in vitro Sprossung mittels 2'O-methyloligonukleotide, die miR-92 blockieren.

(B/C/D/E) Der Effekt der systemischen Fusion eines Antagomirs auf die in vivo Neovaskularisierung. (B) experimentelles Design, (C) Expression von miR-92 in verschiedenen Organen (Herz, Aorta, Milz, Leber). (D) Effekte auf die Perfusion gemäß der Messergebnisse der Hämoglobinkonzentration, (E) repräsentative Bilder (H&E-Färbung) zur Darstellung der Gefäßbildung.

[0043] **Fig. 4:** Die Identifizierung von miR-92 Zielmolekülen.

(A) Genexpressionsprofil HUVEC nach Behandlung mit prä-miR-92.

(B/C) Bestätigung der Dysregulation der Proteinexpression durch Western Blot in HUVEC nach Transfektion von prä-miR-92.

(D/E) Detektion des Effekts von prä-miR-92 auf die Integrinexpression mittels FACS.

Beispiele

Material und Methoden

Zellkultur

[0044] Menschliche Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) wurden von Cambrex erworben und in endotheliale BasalmEDIUM (EBM; Cambrex) ergänzt mit Hydrokortison, Rinderhirnextrakt, epidermalem Wachstumsfaktor und 10% fötalem Kälberserum (FCS; Gibco) bis zur dritten Passage kultiviert. Nach dem Ablösen mit Trypsin wurden die Zellen in 6 cm Kulturschalen für mindestens 24 bis 48 Stunden kultiviert.

Transfektion

[0045] Zur Inhibition von miR-92 wurden HUVEC vor der Transfektion mit dem spezifischen Inhibitor bis zu einer Konfluenz von 60% bis 70% kultiviert. 2'O-methylantisense Oligoribonukleotide gegen miR-92 (5'-CAGG-CCGGACAAGUGCAAUA-3', SEQ ID NO 6) oder GFP (5'-AAGGCAAGCUGACCCUGAAGUU-3', SEQ ID NO 7) wurden von VBC Biotech synthetisiert und 50 nmol/l wurden mit GeneTrans II® (MoBiTec) gemäß dem Protokoll des Herstellers transfiziert. Zur Überexpression von miR-92 wurden HUVEC bis zu einer Konfluenz von 50% kultiviert. 10 nmol/l prä-miR-92 oder Kontroll-prä-miR (Ambion) wurden mit Lipofectamin RNAiMAX (Invitrogen) gemäß dem Protokoll des Herstellers transfiziert.

Antagomir-Strategie

[0046] Die hier verwendete einzelsträngige RNA bestand aus 21 bis 23 Nukleotiden und wurde von VBC Biotech wie beschrieben (13) synthetisiert. Alle Tiermodelle wurden in einem C57BL/6J Hintergrund gehalten. Acht Wochen alte Mäuse wurden subkutan entlang der abdominalen Mittellinie mit zwei „Matrigel Basement Matrix Plugs“ am Tag 0 injiziert und erhielten Schwanzveneninjektionen einer Salzlösung oder eines Antagomirs 92 am Tag 1, 3 und 5. Antagomir 92 wurde in Dosen von 8 mg pro kg Körpergewicht in 0,2 ml Phosphat gepufferte Saline (PBS) pro Injektion verabreicht. Gewebe und „Matrigel Plugs“ wurden am sechsten Tag geerntet. Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und zur RNA Analyse bei -80°C aufbewahrt. Zur Hämoglobinanalyse wurde ein „Matrigel Plug“ nach sieben Tagen entfernt und in 130 μl deionisiertem Wasser homogenisiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in einem Drabkin Assay (Sigma-Aldrich) zur Mes-

sung der Hämoglobinkonzentration verwendet. Stammlösungen des Hämoglobins wurden zur Herstellung einer Standardkurve verwendet. Die Ergebnisse werden relativ zum Gesamtprotein in Überstand ausgedrückt. Der zweite „Matrigel Plug“ wurde zur Quantifizierung eindringender Zellen mittels H&E-Färbung verwendet.

Western Blot Analyse

[0047] Zur Western Blot Analyse wurden HUVEC in RIPA Lyse Puffer (Sigma) für 20 Minuten auf Eis lysiert. Nach einer Zentrifugation für 15 Minuten bei $20.000 \times g$ (4°C) wurde der Proteingehalt der Proben nach der Bradford Methode bestimmt. Gleiche Proteinmengen wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen und auf eine PVDF oder Nitrozellulosemembran gebロットet. Western Blots wurden unter Verwendung von Antikörpern gegen Integrin $\alpha 5$ (Kaninchen polyklonaler Anti-Integrin $\alpha 5$ Antikörper; 1:250, Chemicon), MKK4 (Kaninchen polyklonaler Anti-MKK4, 1:1.000, Cell Signaling), eNOS (Maus monoklonaler Anti-eNOS, 1:2.500, BD), SIRT1 (Kaninchen polyklonaler Anti-SIRT1, 1:1.000, Upstate) oder Tubulin (Maus monoklonaler Anti-Tubulin; 1:1.500, Dianova) durchgeführt.

RT-PCR

[0048] Um die differenzielle miRNA Expression in HUVEC zu bestimmen, die mit 2'O-methylantisens Oligoribonukleotiden gegen miR-92 oder Prä-miR-92 transfiziert wurden, wurde 24 Stunden nach der Transfektion Gesamt RNA unter Verwendung von TRIzol (Invitrogen) gemäß dem Protokoll des Herstellers isoliert. Eine RT-PCR wurde unter Verwendung des mirVana™ qRT-PCR miRNA Detektionskit (Ambion) und Primersets durchgeführt, die zur Amplifikation von hsa-miR-92 (Ambion) spezifisch sind (ein Zyklus: 3 Minuten bei 95°C , 25 Zyklen: 15 Sekunden bei 95°C , 30 Sekunden bei 60°C).

Migrationsassay

[0049] Um die Migration von Endothelzellen zu bestimmen, wurden HUVEC mit Trypsin abgelöst, durch Zentrifugation geerntet und in 500 μl EBM mit 0,1 BSA resuspendiert, gezählt und in die obere Kammer einer modifizierten Boydenkammer (5×10^4 Zellen pro Kammer, Porengrößen 8 μm , BD Biosciences) platziert, die mit 2,5 $\mu\text{g/l}$ Fibronectin beschichtet war. Die Kammer wurde in eine Kulturschale mit 24 Vertiefungen platziert, welche EBM mit 0,1% BSA und menschlichem vaskulären endotheliale Wachstumfaktor (VEGF, 50 ng/ml) enthielten. Nach einer Inkubation für 5 Stunden bei 37°C wurden die nicht migrierenden Zellen auf der oberen Seite der Kammer mechanisch entfernt und die verbleibenden Zellen auf der unteren Seite wurden mit 4% Formaldehyd fixiert. Zur Quantifizierung wurden die Zellkerne mit 4',6-Diaminophenylidol (DAPI) gefärbt. Migrierende Zellen auf der unteren Seite der Kammer wurden in fünf zufällig gewählten mikroskopischen Feldern manuell gezählt.

Gefäßbildungsassay

[0050] HUVEC (7×10^4) wurden in einer Platte mit 12 Vertiefungen (Greiner) beschichtet mit 200 μl „Matrigel Basement membrane Matrix“ (BD Biosciences) kultiviert. Die gebildeten endothelialen Netzwerke wurden nach 24 Stunden in fünf zufällig gewählten mikroskopischen Feldern mittels eines computergesteuerten Mikroskops unter Verwendung des Programms KS300 3.0 (Zeiss) quantifiziert.

Spheroid basierter Angiogenese Assay

[0051] Endotheliale Zellspheroide von definierter Zellzahl wurden wie beschrieben hergestellt (22, 23). Die in vitro Angiogenese wurde durch Messung der kumulativen Länge der gesprossenen Strukturen ermittelt, die aus jedem Spheroid gewachsen waren, und zwar unter Verwendung einer digitalen Bildsoftware (Axioplan, Zeiss), wobei 10 Spheroide pro experimenteller Gruppe und Experiment analysiert wurden.

MTT Viabilitätsassay

[0052] Die Messung der Zellviabilität erfolgte unter Verwendung des (3-(3,4-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) (MTT Assays). 48 Stunden nach der Transfektion wurden 0,5 mg/ml MTT in jede Vertiefung gegeben und die Zellen wurden für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Lysepuffer (40 nmol/l HCl in Isopropanol) lysiert. Die Absorption wurde bei 550 nm fotometrisch gemessen.

Zellmatrix Adhäsion

[0053] Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen wurden über Nacht bei 4°C mit 1 µg/ml löslichem rekombinatem humanem Kollagen I (Roche, Mannheim, Deutschland) oder 2,5 µg/ml humanem Fibronectin (Roche, Mannheim, Deutschland) in PBS beschichtet und dann für ein Stunde bei Raumtemperatur mit 3% (w/v) Hitze-inaktiviertem (2 Stunden, 56°C) humanem Serumalbumin (HSA) inkubiert. HUVEC wurden mit 2',7'-Bis-(2-carboxyethyl)-5-(und-6)-carboxyfluoresceinacetoxymethylester (BCECF-AM) oder CellTracker Green (Molecular Probes, Eugene, Oregon) gefärbt und nach der Ablösung mit Trypsin in EBM mit 0,05% HSA resuspendiert. Dann wurden 50.000 Zellen pro Vertiefung in 100 µl EBM mit 0,05% HSA in die beschichteten Vertiefungen ausgesät und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dem Auswaschen nicht-adhärerender Zellen mit warmem EBM wurden die adhären Zellen dreifach mit einem Fluoreszenzplattenlesegerät (Fluostat, BMG Lab Technologies, Offenburg, Deutschland) quantifiziert.

Durchflusszytometrieanalyse

[0054] Zur Permeabilisierung wurden mit prä-miR-92 oder Kontrolle transfizierte HUVEC mit Trypsin abgelöst, in 4% Formaldehyd für 10 Minuten fixiert und mit 0,1% TritonX-100 behandelt. Die Zellen (permeabilisiert und nicht-permeabilisiert) wurden unter Verwendung von 1% BSA blockiert und mit Integrin α5 (Anti-CD49e-FITC 1:10, Immunotech) oder Integrin β1 (Anti-CD29-APC 1:20, BD) Antikörpern gefärbt. Die Zellen wurden mit einem FACS Canto II Gerät (BD) analysiert.

In vivo „Matrigel Plug“ Assay

[0055] Dieser Assay wurde wie beschrieben (24) durchgeführt, jedoch mit den folgenden Modifikationen: HUVEC wurden mit prä-miR-92 oder zur Kontrolle wie oben beschrieben transfiziert. 18 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit „cell tracker CM-Dil“ (Invitrogen) markiert, abgelöst, gewaschen und gezählt. 1×10^6 Zellen wurden in 30 µl PBS resuspendiert und mit 500 µl „Matrigel Basement Membrane Matrix“ (BD Biosciences) 15 Einheiten Heparin (Sigma-Aldrich) enthaltend, gemischt. Die Zell-Matrigel-Mischung wurde in sechs bis acht Wochen alte weibliche athymische Nackt-Mäuse (Harlan) entlang der abdominalen Mittellinie subkutan injiziert. Hämoglobinanalyse and H&E-Färbung wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Affymetrix mRNA Profiling

[0056] HUVECs wurden mit prä-miR-92 oder zur Kontrolle transfiziert. Gesamt RNA wurde nach 48 Stunden isoliert und das Genexpressionsprofil wurde mittels eines Affymetrix-Gen-Chip-Expressionsassays gemessen

Ergebnisse

Prä-miR-92 blockiert endotheliale Zellfunktionen in vitro und in vivo

[0057] Um den Effekt von miR-92 auf Endothelzellen zu testen, wurden HUVEC mit dem miR-92 Vorläufer prä-miR-92 transfiziert und der Effekt dieser Transfektion in verschiedenen in vitro Assays bestimmt. Die effiziente Überexpression von miR-92 wurde zunächst mittels RT-PCR nachgewiesen (**Fig. 1A**). Die miR-92 Überexpression blockierte signifikant die Bildung von Gefäßstrukturen in einem Sphäroidassay (**Fig. 1B**) und inhibierte die Bildung eines vaskulären Netzwerkes in Matrigelen (**Fig. 1C**), was dafür spricht, dass miR-92 ein negativer Regulator der Angiogenese in vitro ist. Um einen möglicherweise toxischen Effekt von miR-92 zu ermitteln, wurde die Zellviabilität gemessen. Dabei konnten nach Transfektion von prä-miR-92 im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (**Fig. 1D**). Da die endotheliale Zellmigration für die Angiogeneseaktivität von Zellen in vitro von großer Bedeutung ist, wurde zusätzlich die Migration von HUVEC unter basalen Bedingungen und als Antwort auf VEGF bestimmt. Prä-miR-92 verringerte die Migration (**Fig. 1E**) und die Adhäsion der Zellen auf Fibronectin (**Fig. 1F**). Daher zeigt prä-miR-92 keinen direkten toxischen Effekt, sondern blockiert die endotheliale Zellantwort, die für Angiogenese benötigt wird. Weiterhin wurde der Effekt von prä-miR-92 auf die Angiogenese in vivo bestimmt. Dazu wurden mit prä-miR-92 transfizierte HUVEC in einen „Matrigel Plug“ in Nacktmäuse in vivo implantiert. Die Effizienz der Inhibierung wurde jeweils in einer Subfraktion der implantierten Zellen kontrolliert (**Fig. 2A**). Wie in den repräsentativen Bildern der **Fig. 2B** und der Quantifizierung in **Fig. 2C** gezeigt ist, blockiert prä-miR-92 das Wachstum der Gefäße in vivo in effizienter Weise. Außerdem ist die Perfusion signifikant reduziert, was durch Messung der Hämoglobinkonzentration in den explantierten „Matrigel Plugs“ nachgewiesen werden konnte (**Fig. 2B**).

[0058] Weiterhin wurde untersucht, ob die Inhibierung von miR-92 die Stimulation des Gefäßwachstums zur Folge hat. MiR-92 wurde durch 2'-O-methyl antisens Oligoribonukleotide (O-methyl-miR-92) inhibiert und die Bildung von Gefäßstrukturen in vitro wurde mittels eines Spheroidassays bestimmt. O-methyl-miR-92 erhöhte die Sprossenbildung in vitro ([Fig. 3A](#)), was dafür spricht, dass die Inhibierung von miR-92 eine neue therapeutische Strategie zur Verbesserung der Angiogenese darstellen könnte. Um diese Hypothese zu testen, wurde miR-92 unter Verwendung so genannter „Antagomirs“, einzelsträngige RNA Oligonukleotide, die gegenüber spezifischen miRNAs eine komplementäre Sequenz aufweisen, systemisch inhibiert. Chemische Modifikationen führen zu einer erhöhten Stabilität und Cholesterol-Konjugation zu einer verbesserten Aufnahme in die Zellen (15). Gegen miR-92 gerichtete Antagomirs wurden wie in [Fig. 3B](#) dargestellt an drei Tagen verabreicht. Die systemische Gabe von Antagomirs verbesserte das Gefäßwachstum und die Perfusion des „Matrigel Plugs“ in vivo ([Fig. 3C/D](#)). Im Ergebnis erhöht die Inhibierung von miR-92 endotheliale Zellfunktionen in vitro und verbessert das Gefäßwachstum in vivo.

Identifizierung von miR-92 Ziel-Genen

[0059] miRNAs kontrollieren Zielgene durch Abbau der Ziel-mRNA oder durch translationale Repressionen. Um die Ziel mRNAs bestimmen zu können, die als Antwort auf die miR-92 Überexpression abgebaut werden, wurde eine Chipanalyse mit einem Affymetrix mRNA Genexpressionsarray mit 54.681 Genen (HG-U133 Plus 2) durchgeführt. Die Analyse der regulierten mRNAs identifizierte verschiedene Schlüsselenzyme, die die endotheliale Funktion kontrollieren, einschließlich eNOS, SIRT1, Integrin und Wachstumsfaktoren wie Angiopoietin-2 ([Fig. 4A](#)). Ein Teil der herunterregulierten Gene sind mit einer in silico durchgeführten Analyse potentieller miR-92 Ziele kompatibel (Tabelle 1). Um die Ergebnisse des Screens zu bestätigen, wurde die Proteinexpression der jeweiligen Gene durch Western Blot oder FACS Analyse detektiert. Im Einklang mit den vorhergesagten Ergebnissen wurde die Proteinexpression von eNOS, SIRT1 und Integrin $\alpha 5$ durch prä-miR-92 signifikant unterdrückt ([Fig. 4B bis E](#)).

Tabelle 1: In silico Vorhersage von miR-92 Zielen

miR-92-Ziele
Integrin $\alpha 5$
Integrin αv
SIRT 1
MKK4
KLF 2
PCAF
EDG 1
RAP 1B

[0060] Im Ergebnis zeigt miR-92 einen starken anti-angiogenen Effekt und beeinflusst endotheliale Zellfunktionen in vitro und in vivo negativ. In Übereinstimmung damit führt die Blockade von miR-92 durch systemische Infusion eines Antagomirs zu einem verbesserten Gefäßwachstum in vivo. Dieses Ergebnis ist überraschend, da es im Gegensatz zur beschriebenen pro-angiogenen Aktivität des miR-17-92 Clusters steht (10).

[0061] Die vorliegenden Daten zeigen, dass miR-92 die Expression verschiedener Proteine beeinflusst, die dafür bekannt sind, eine tragende Rolle in der endothelialen Zellbiologie zu spielen. Unter den mittels eines Mikroarrays identifizierten Genen konnte insbesondere die Herunterregulation von eNOS, SIRT1 und Integrin $\alpha 5$ auf Proteinebene bestätigt werden. Mäuse, die für diese Proteine defizient sind, zeigen eine beeinträchtigte vaskuläre Funktion und/oder eine beeinträchtigte Fähigkeit zur postnatalen Neovaskularisierung.

[0062] eNOS spielt eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Vasoreaktivität und blockiert Apoptose endothelialer Zellen (16). Die Histondeacetylase SIRT1 fördert die Langlebigkeit in Modellorganismen und kontrolliert die Neovaskularisierung und Gefäßreifung in Säugern (13, 17). Die Dysregulation von Integrinen kann sich negativ auf die Interaktion mit der Zellmatrix auswirken und somit anti-apoptische Signalgebung und Zellmigration beeinträchtigen (14, 18). Der Wachstumsfaktor Angiopoietin-2, sein Rezeptor Tie2 und die Proteaseinhibitoren wie TIMP4 kontrollieren die Gefäßreifung (19, 20). Demzufolge interagiert miR-92 mit einer Reihe von

Genen, die endotheliale Zellfunktionen auf verschiedenen Ebenen kontrollieren. Die Fähigkeit von miR-92 verschiedene Effektoren zu beeinflussen, stellt einen Vorteil der miRNA-basierten therapeutischen Strategie dar und trägt dazu bei, über die beschränkte therapeutische Kapazität einer auf einem einzigen Wachstumsfaktor oder einem einzigen Gen basierenden Therapie einer ischämischen Krankheit hinwegzukommen, da die komplexen Prozesse des Gefäßwachstums, der Gefäßreifung und der funktionalen Erhaltung der Gefäße bekannter Weise eine fein abgestimmte Regulation einer Reihe von Genen voraussetzen.

[0063] Im Ergebnis stellt die Beeinflussung von miR-92 eine neuartige therapeutische Strategie zur Kontrolle endothelialer Zellfunktionen dar. Insbesondere die hier gezeigte systemische Verwendung von Antagomirs ist zur Beeinflussung der miRNA Funktionen geeignet. Die Inhibierung von miR-92 durch Antagomirs erhöht das Gefäßwachstum und trägt zur Verbesserung der Neovaskularisierung und der Gefäßreparation bei. In Bezug auf die Gene, die für ihre artheroprotektive Wirkung bekannt sind, wie beispielsweise eNOS, ist die Blockade von miR-92 in der antiarteriosklerotischen Therapie von Nutzen. Da SIRT 1 auch eine neuroprotektive Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen (z. B. Parkinson) zugeschrieben wird (25), können miR-92 Antagomirs auch in diesem Krankheitsbild erfolgreich eingesetzt werden. Im Gegensatz dazu ist die Überexpression von miR-92 beispielsweise zur Blockade der Tumorangiogenese nützlich, da durch sie das Gefäßwachstum stark verringert wird.

Referenzen

[0064]

- 1 Carmeliet, P. (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6 (4), 389–395.
- 2 Adams, R. H. and Alitalo, K. (2007) Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (6), 464–478
- 3 Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116 (2), 281–297
- 4 Hofacker, I. L. (2007) How microRNAs choose their targets. *Nat Genet* 39 (10), 1191–1192
- 5 Yang, W. J. et al. (2005) Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem* 280 (10), 9330–9335
- 6 Suarez, Y. et al. (2007) Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res* 100 (8), 1164–1173
- 7 Kuehnbacher, A. et al. (2007) Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res* 101 (1), 59–68
- 8 Polisenio, L. et al. (2006) MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* 108 (9), 3068–3071
- 9 Venturini, L. et al. (2007) Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. *Blood* 109 (10), 4399–4405
- 10 Dews, M. et al. (2006) Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet* 38 (9), 1060–1065
- 11 Murohara, T. et al. (1998) Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 101 (11), 2567–2578
- 12 Aicher, A. et al. (2003) Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med* 9 (11), 1370–1376
- 13 Potente, M. et al. (2007) SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev* 21 (20), 2644–2658
- 14 Kim, S. et al. (2000) Regulation of integrin alpha v beta 3-mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin alpha 5 beta 1 and protein kinase A. *J Biol Chem* 275 (43), 33920–33928.
- 15 Krutzfeldt, J. et al. (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438 (7068), 685–689
- 16 Dimmeler, S. and Zeiher, A. M. (1999) Nitric oxide – an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ* 6, 964–968
- 17 Imai, S. et al. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403 (6771), 795–800.
- 18 Zhang, Z. et al. (1995) The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 (13), 6161–6165
- 19 Asahara, T. et al. (1998) Tie2 receptor ligands, Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* 83, 233–240
- 20 Sang, Q. X. (1998) Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res* 8 (3), 171–177
- 21 Care, A. et al. (2007) MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 13 (5), 613–618
- 22 Korff, T. and Augustin, H. G. (1998) Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol* 143 (5), 1341–1352
- 23 Diehl, F. et al. (2007) The histone methyltransferase MLL is an upstream regulator of endothelial cell sprout

formation. *Blood* 109 (4), 1472–1478

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

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

SEQUENCE LISTING

<110> Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

<120> Verfahren zur Modulation der Funktion, des Wachstums oder der Differenzierung einer Zelle

<130> U60023

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 78
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 cuuucuacac agguugggau cgguugcaau gcuguguuuc uguaugguau ugcacuuguc 60
 ccggccuguu gaguuugg 78

<210> 2
 <211> 75
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 ucaucccugg guggggauuu guugcauuac uuguguucua uauaaaguau ugcacuuguc 60
 ccggccugug gaaga 75

<210> 3
 <211> 96
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 cgggccccgg gcgggcggga gggacgggac gcggugcagu guuguuuuuu cccccgcaa 60
 uauugcacuc gucccggccu ccggcccccc cggccc 96

<210> 4
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 uauugcacuu gucccggccu gu 22

<210> 5
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 uauugcacuc gucccggccu cc 22

<210> 6
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> artificial

<220>
 <223> 2'-methyl-antisens oligoribonukleotid gegen miR-92
 <400> 6
 caggccggga caagugcaau a 21

<210> 7
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> artificial

<220>
 <223> 2'-methyl-antisens oligoribonukleotid gegen GFP
 <400> 7
 aaggcaagcu gaccugaag uu 22

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erhöhung des Gefäßwachstums, der Verbesserung der Neovaskularisierung und der Gefäßreparation oder zur Blockade der Tumorangiogenese, aufweisend die folgenden Schritte:

- Bereitstellen einer Zelle; und
- Verringern der miR-92 Expression in der Zelle zur Erhöhung des Gefäßwachstums, der Verbesserung der Neovaskularisierung und der Gefäßreparation, oder
- Erhöhen der miR-92 Expression in der Zelle zur Blockade der Tumorangiogenese, wobei
- die Verringerung der miR-92 Expression in der Zelle durch Bereitstellung eines antisense Moleküls gegen miR-92 erfolgt, und
- die Erhöhung der miR-92 Expression in der Zelle durch Transfektion der Zelle mit einem Konstrukt erfolgt, das eine exprimierbare miR-92 Sequenz aufweist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die bereitgestellte Zelle eine vaskuläre Zelle, eine hämatopoetische Zelle, eine Herzmuskelzelle, eine inflammatorische Zelle, eine neuronale Zelle, eine Vorläuferzelle oder eine Stammzelle ist, wobei die Stammzelle keine humane embryonale Stammzelle ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die bereitgestellte Zelle von einem Metazoen, insbesondere von einem Säugetier stammt.

4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, wobei das antisense Molekül eine Sequenz aufweist, die zu einer Sequenz gemäß einer der SEQ ID NO 1 bis 5 komplementär ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, wobei das antisense Molekül ein Molekül mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO 6 ist.

6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, wobei das antisense Molekül eine Länge von 15 bis 22 Basen aufweist.

7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die exprimierbare miR-92 Sequenz eine Sequenz gemäß SEQ ID NO 1 bis 5 aufweist.

8. Verwendung eines Verfahrens nach Anspruch 1 bis 7 zur Herstellung von Gefäßersatzmaterial.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Erhöhung des Gefäßwachstums, der Verbesserung der Neovaskularisierung und der Gefäßreparation, aufweisend

- ein Mittel zur Verringerung der miR-92 Aktivität oder Expression in einer Zelle in Form eines antisense Moleküls, das eine Sequenz aufweist, die zu einer Sequenz gemäß einer der SEQ ID NO 1 bis 5 komplementär ist.

10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 9, wobei das antisense Molekül ein Molekül mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO 6 ist.

11. Pharmazeutische Zusammensetzung zur Blockade der Tumorangiogenese, aufweisend,

- ein Mittel zur Erhöhung der miR-92 Expression in der Zelle in Form eines Konstrukts zur Expression von

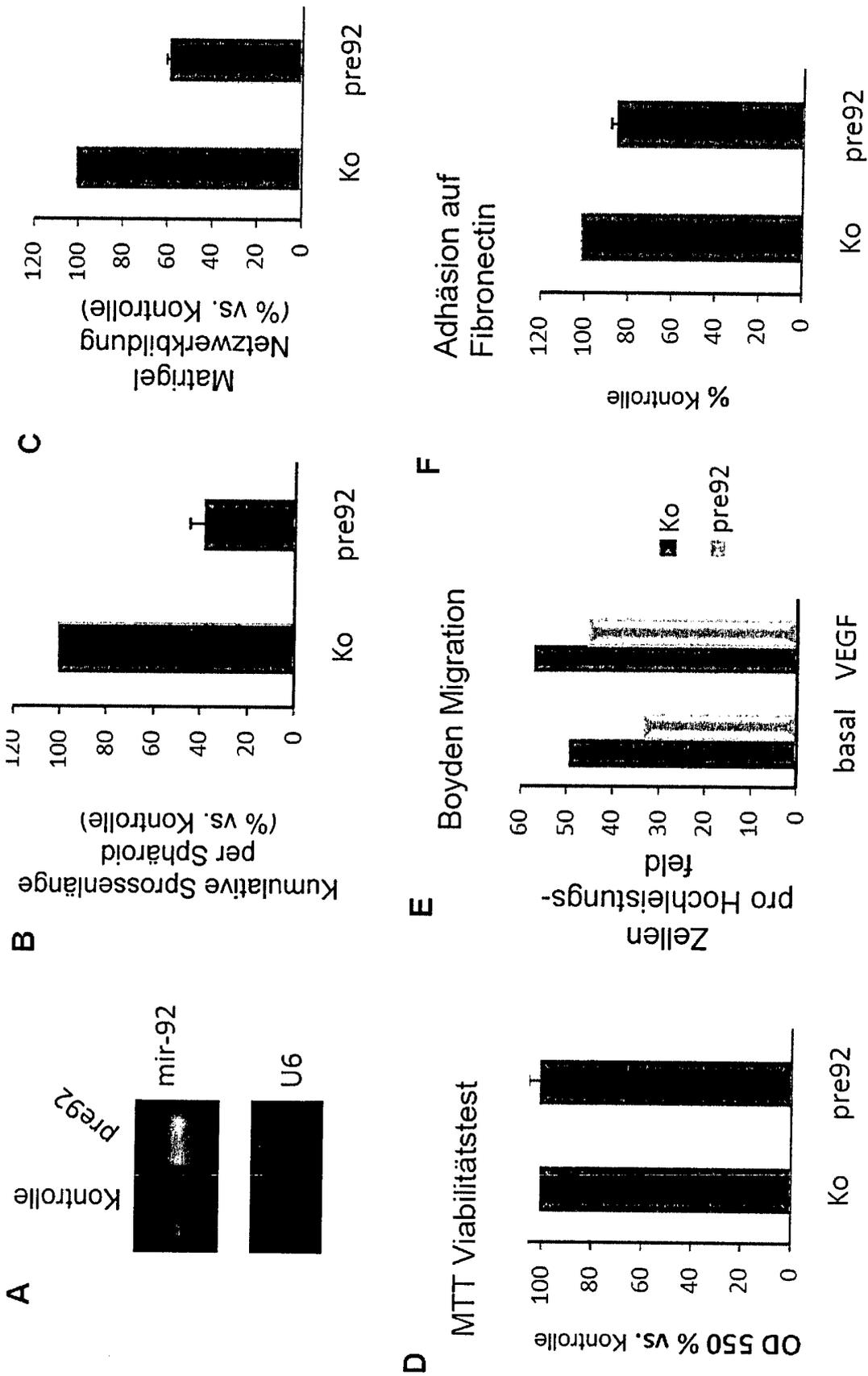
miR-92.

12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei das Konstrukt eine exprimierbare Sequenz gemäß einem der SEQ ID NO 1 bis 5 aufweist.

13. Verwendung von miR-92 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung der Ansprüche 9 bis 12 zur Behandlung von Ischämie, pathologischer Angiogenese, Artherosklerose, Folgeerkrankungen der Artherosklerose oder Alterungs-assoziierte Krankheiten.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

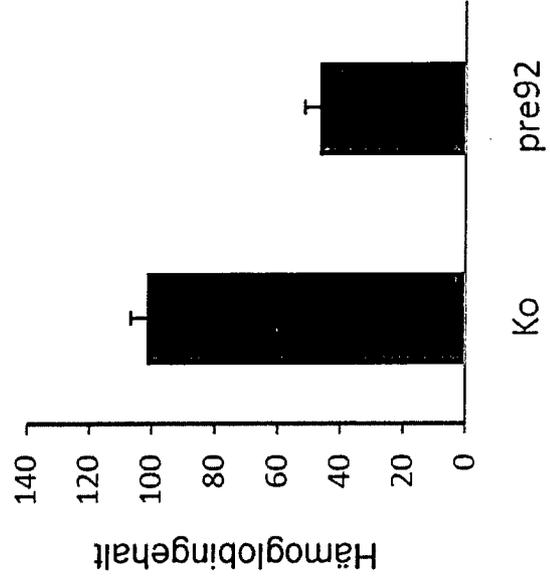
Anhängende Zeichnungen



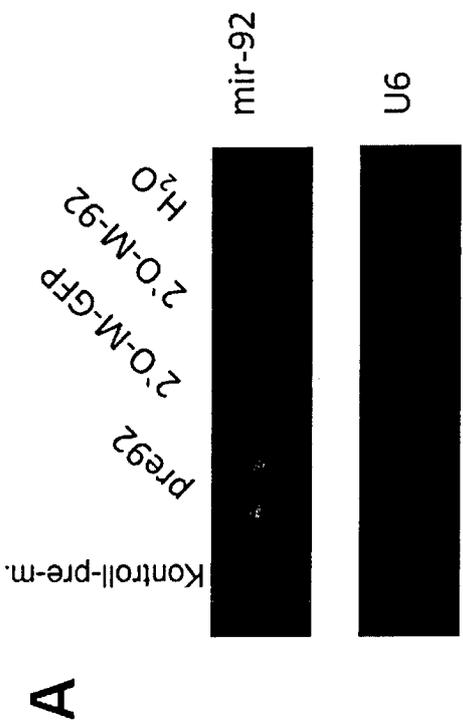
Figur 1



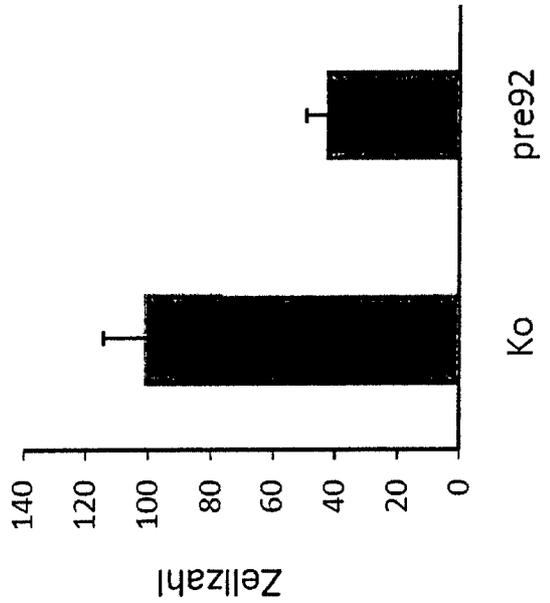
D Matrigel „Plug“ / mir-92 Überexpression

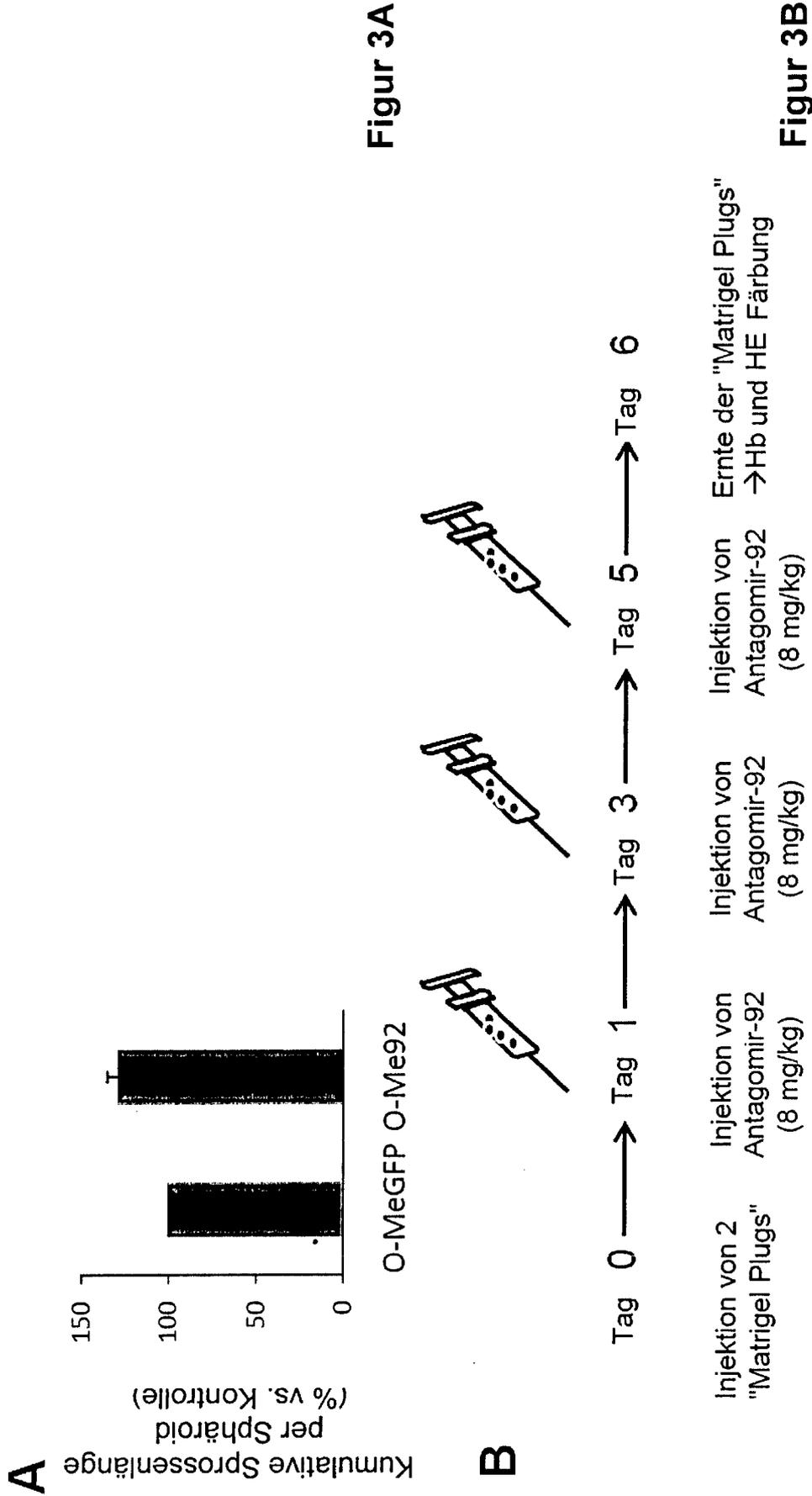


Figur 2



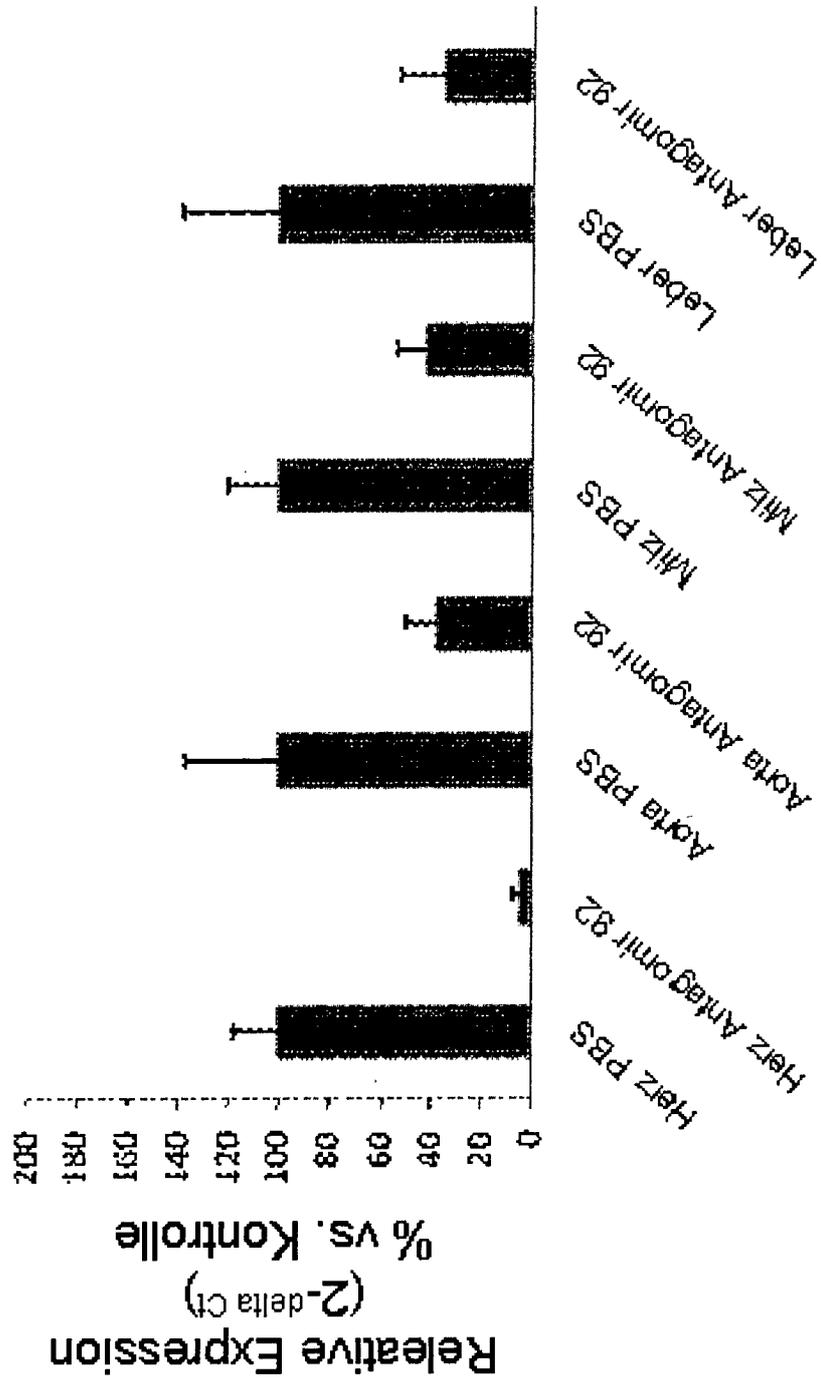
D Matrigel „Plug“ / mir-92 Überexpression





Figur 3A

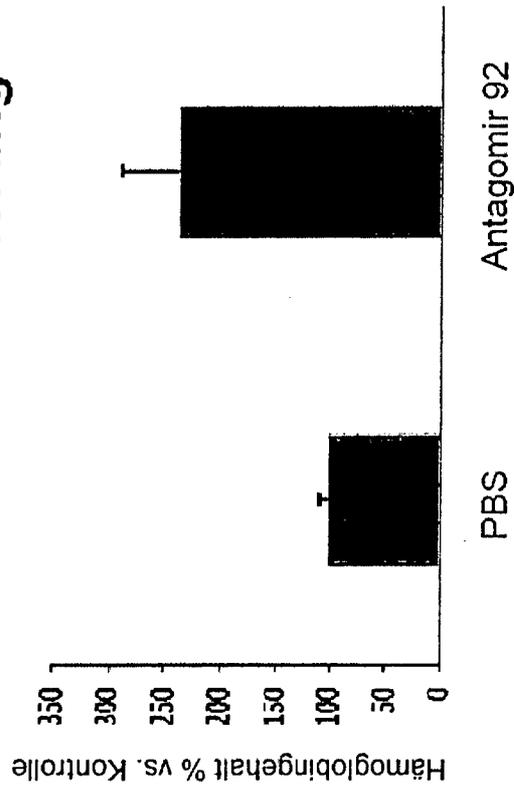
Figur 3B



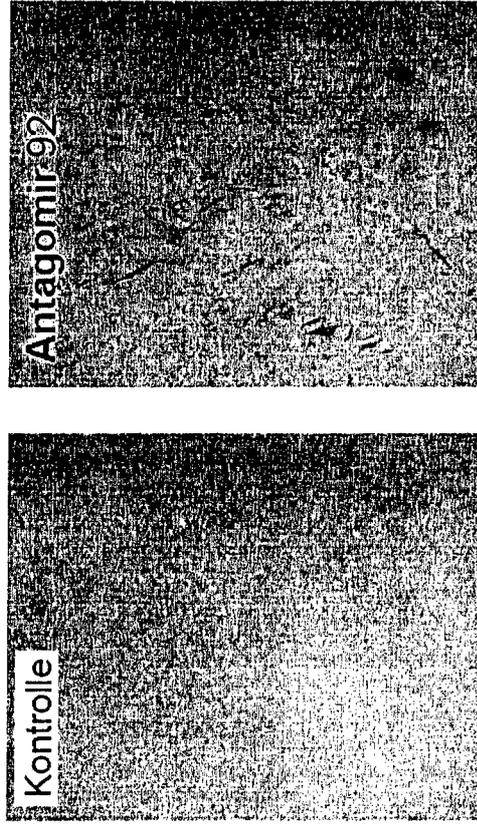
Figur 3C

C

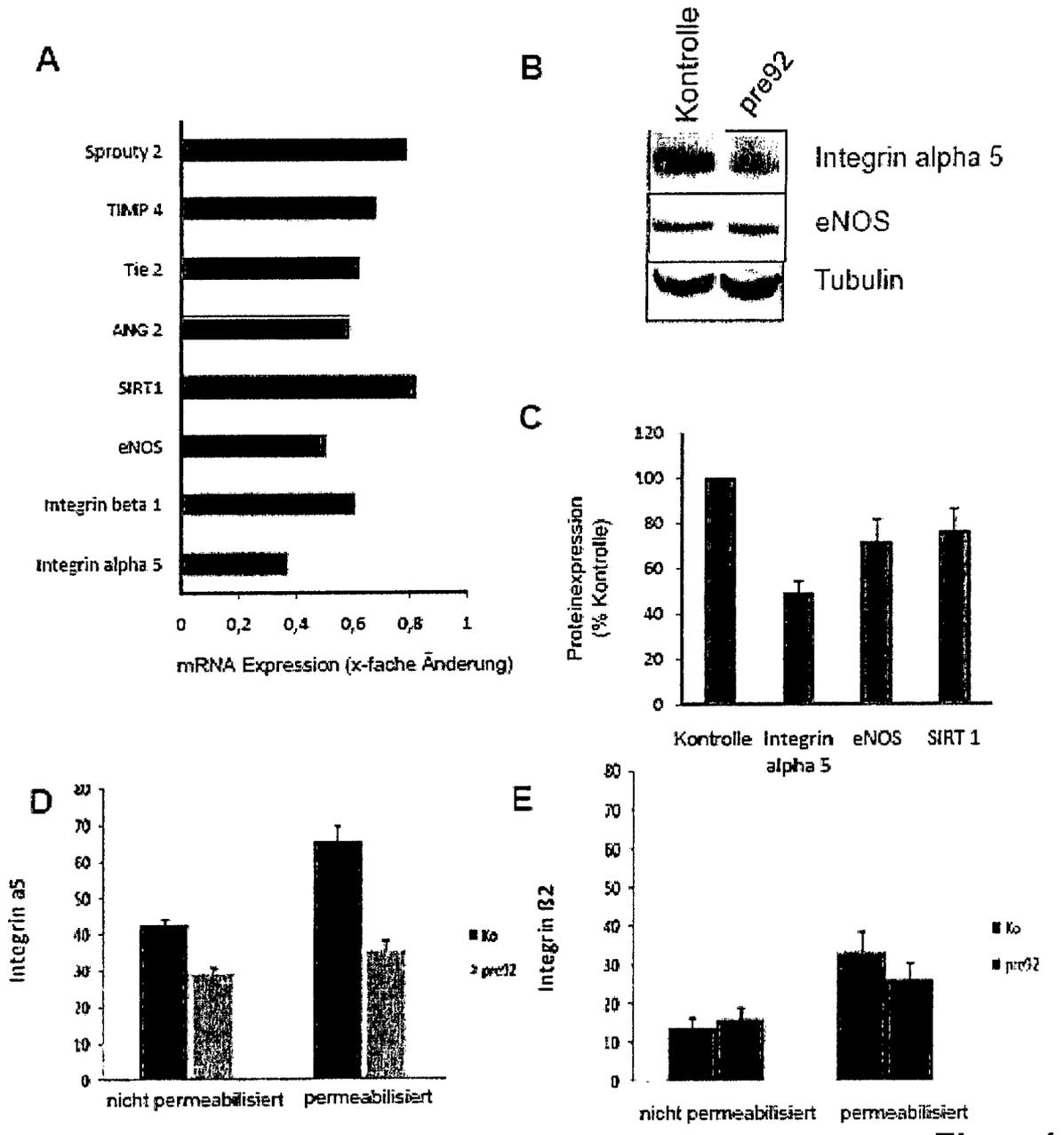
D In vivo
E Neovaskularisierung



Figur 3D



Figur 3E



Figur 4